



М И Р Х И М И И

Ю. БЁККЕР

Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза

Перевод с немецкого В.С. Куровой
под редакцией А.А. Курганова

ТЕХНОСФЕРА

Москва

2009

Содержание

Предисловие	17
Предисловие автора	18
Глава 1. Введение	22
1.1. Знание – сила	27
Глава 2. Техника хроматографии	29
2.1. История хроматографии	29
2.1.1. Путь развития	31
2.2. Принцип	33
2.2.1. Классификация по типу агрегатного состояния фаз	34
2.2.2. Классификация по типу процесса разделения	34
2.2.3. Классификация по технике проведения	36
2.3. Теоретические основы	36
2.3.1. Хроматографический процесс	36
2.3.2. Уширение зон	38
2.4. Колоночная хроматография	40
2.4.1. Хроматограмма и что она дает	41
2.4.2. Теоретические тарелки	43
2.4.3. Диаграмма Ван-Деемтера	44
2.4.4. Аппаратура	46
2.4.4.1. Система насосов	46
2.4.4.2. Ввод пробы	46
2.4.4.3. Хроматографическая колонка	47
2.4.4.4. Детектор	47
2.5. Интеграторы	53
2.5.1. Преимущества интеграторов	54
2.5.2. Процесс интегрирования	54
2.5.3. Критерии выбора при приобретении интегратора	56
Глава 3. Газовая хроматография	58
3.1. Принцип	59
3.2. Система подачи газа	60
3.2.1. Поток газа-носителя	61
3.2.2. Работа с хроматографическими колонками	62
3.2.2.1. Регулятор давления	62
3.2.2.2. Регулятор потока	63
3.3. Колонки для газовой хроматографии	64
3.3.1. Наполненные колонки	65
3.3.2. Капиллярные колонки	67
3.3.2.1. Фазовое отношение	69
3.3.3. Выбор колонки	70
3.3.3.1. Полярность фаз	72
3.3.3.2. Внутренний диаметр колонки	73

3.3.3.3. Оптимальная толщина пленки	74
3.3.3.4. Выбор длины колонки	75
3.3.3.5. Анализ газов	76
3.3.4. Переключение колонок	76
3.4. Термостаты	78
3.5. Систематическое развитие метода ГХ	81
3.6. Ввод пробы	83
3.6.1. Газообразные пробы	83
3.6.1.1. Газонепроницаемые шприцы	84
3.6.1.2. Газодозирующие петли и многоходовые краны	84
3.6.2. Жидкие пробы	85
3.6.2.1. Ввод пробы с помощью испарения	87
3.6.3. Подача пробы на капиллярные колонки	87
3.6.3.1. Классические методы ввода пробы	88
3.6.3.2. Ввод пробы непосредственно в колонку (On-column)	90
3.6.3.3. Холодная система ввода пробы	92
3.6.4. Ввод пробы с помощью дозирующей петли	93
3.6.5. Твердые пробы	93
3.6.6. Пиролиз	94
3.6.7. Нестабильные образцы	95
3.6.8. Уплотняющая прокладка инжектора	95
3.6.8.1. Ввод пробы без уплотняющей прокладки	97
3.7. Газохроматографические детекторы	98
3.7.1. Основные характеристики детектора	99
3.7.1.1. Концентрационные детекторы	99
3.7.1.2. Массовые детекторы	100
3.7.1.3. Дополнительный поток газа	100
3.7.1.4. Обзор детекторов в ГХ	101
3.7.2. Детектор по теплопроводности	102
3.7.3. Пламенно-ионизационный детектор	105
3.7.4. Детектор электронного захвата	107
3.7.5. Азотно-фосфорный детектор	109
3.7.6. Пламенно-фотометрический детектор	110
3.7.7. Детектор по электролитической проводимости	112
3.7.8. Фотоионизационный детектор	113
3.7.9. Детектор дальнего УФ диапазона	114
3.7.10. Гелиевый ионизационный детектор	115
3.7.11. Редокс-хемиллюминесцентный детектор	115
3.8. Комбинированные методы газовой хроматографии	116
3.8.1. Масс-спектрометр	117
3.8.1.1. Квадрупольный масс-спектрометр	120
3.8.1.2. Работа с ГХ-МС	122
3.8.1.3. Химическая ионизация	125
3.8.1.4. Метод изотопного разбавления в МС-ГХ	125
3.8.1.5. Техника ГХ-МС/МС	126

3.8.2. ГХ-ИК-Фурье	128
3.8.2.1. Комбинация ГХ-ИК-Фурье и МС	131
3.8.3. Атомно-эмиссионный детектор	133
3.8.4. Комбинация ЖХ-ГХ	135
3.9. Какой детектор нужно применять для какой пробы?	136
3.10. Выбор газа-носителя	136
3.10.1. Дополнения по очистке газа-носителя	139
3.11. Многомерная ГХ	140
3.11.1. Коллектор фракций в ГХ	143
3.12. Высокотемпературная газовая хроматография	143
3.12.1. Колонки для ВТГХ	144
3.12.2. Инструментальные условия	145
3.13. Анализ паровой фазы (Headspace анализ)	147
3.13.1. Практика проведения анализа паровой фазы	148
3.13.1.1. Статический анализ паровой фазы	148
3.13.1.2. Динамический анализ паровой фазы	150
3.13.2. Основы количественного анализа паровой фазы	151
3.13.3. Холодная система ввода как метод обогащения	152
3.14. Выводы и обзор	153
3.14.1. Хроматографические колонки	154
3.14.1.1. Разделение энантиомеров	156
3.14.1.2. Скоростные анализы (экспресс-ГХ)	157
3.14.1.3. Высокотемпературная ГХ	158
3.14.2. Приборы/методики	158
3.14.2.1. Пробоподготовка	159
3.14.2.2. Ввод пробы	160
3.14.2.3. Программирование давления газа-носителя	160
3.14.2.4. Многомерная колоночная техника	162
3.14.2.5. Детектирование/методы гибридизации	162
3.14.2.6. Программное обеспечение	165
3.14.2.7. Миниатюризация	166
3.14.2.8. Полевой анализ	166
Глава 4. Высокоэффективная жидкостная (колоночная) хроматография	168
4.1. ВЭЖХ оборудование	171
4.2. Насосы для ВЭЖХ	172
4.2.1. Шприцевые насосы периодического действия	173
4.2.2. Насосы непрерывного действия	174
4.3. Градиентное элюирование	178
4.3.1. Градиент низкого давления	181
4.3.2. Градиент высокого давления	183
4.3.3. Оптимизация градиента	185
4.4. Системы ввода пробы	185
4.4.1. Ввод пробы через прокладку	186
4.4.2. Дозирующая петля	186

4.5. Колонки для ВЭЖХ	188
4.5.1. Нормальнофазовая хроматография	189
4.5.2. Химически привитые полярные фазы	190
4.5.2.1. Диольная фаза	191
4.5.2.2. NH_2 фаза	191
4.5.2.3. CN фаза	192
4.5.3. Обращеннофазовая хроматография	192
4.5.4. Эксклюзионная хроматография	196
4.6. Выбор методов ВЭЖХ анализа	201
4.6.1. Пробоподготовка	201
4.6.2. Хроматографическое разделение	202
4.6.2.1. Условия нормальнофазовой хроматографии	203
4.6.2.2. Условия обращеннофазовой хроматографии	206
4.6.3. Оптимизация растворителя	207
4.6.3.1. Компьютерная оптимизация	207
4.6.4. Детектирование	209
4.7. ВЭЖХ детекторы	210
4.7.1. Общие требования к ВЭЖХ детекторам	210
4.7.2. Детекторы УФ- и видимого диапазона	212
4.7.3. Детектор с диодной линейкой	217
4.7.4. Дифференциальный рефрактометр	221
4.7.5. Флуоресцентный детектор	222
4.7.5.1. Флуоресценция и фосфоресценция	223
4.7.5.2. Применение флуоресцентного детектора	225
4.7.6. Электрохимический детектор	227
4.7.7. Детекторы светорассеяния	229
4.7.8. Специальные детекторы	231
4.7.9. Транспортные детекторы	231
4.7.10. Комбинированные методы ВЭЖХ	232
4.7.10.1. Хромато-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС)	232
4.7.10.2. ВЭЖХ-ИК	236
4.7.10.3. ВЭЖХ-ЯМР	237
4.7.10.4. ВЭЖХ индукционносвязанная плазма (ИСП)	237
4.7.10.5. ВЭЖХ-ГХ	237
4.8. Производственная ВЭЖХ	238
4.9. Миниатюризация ВЭЖХ	240
4.9.1. Микроколоночная техника	241
4.9.1.1. Преимущества микроколоночной хроматографии	242
4.9.2. Капиллярная ЖХ	243
4.9.2.1. Преимущества капиллярной ЖХ	244
4.9.2.2. Системные ошибки микрометода	246
4.10. Препаративная ВЭЖХ	248
4.11. Выводы	250
4.11.1. Сравнение ГХ-ВЭЖХ	250
4.11.1.1. Хроматографические колонки	252

4.11.1.2. Детекторы	254
4.11.1.3. Приборы	254
4.11.2. ВЭЖХ в экологическом анализе и анализе пищевых продуктов	254
4.11.3. ВЭЖХ в лекарственном анализе	255
4.11.4. ВЭЖХ в биомедицинском анализе	256
4.11.5. Подготовка проб	257
4.11.6. ВЭЖХ колонки	258
4.11.6.1. Другие фазы	258
4.11.6.2. Новые материалы	259
4.11.6.3. Миниатюризация	259
4.11.7. Детекторы	260
4.11.8. Системы обработки результатов	261
4.11.9. Перспективы высокоэффективного анализа	261
Глава 5. Тонкослойная хроматография	263
5.1. ТСХ анализ.....	266
5.2. Стационарные фазы (сорбенты)	267
5.2.1. Химический состав и структура	267
5.2.1.1. Силикагель	267
5.2.1.2. Оксид алюминия	268
5.2.1.3. Целлюлоза	269
5.2.1.4. Полиамид	269
5.2.1.5. Обращеннофазовая ТСХ.....	269
5.2.1.6. Специальные покрытия	270
5.2.2. Характеристики зерна и пористости	270
5.2.3. Параметр слоя	271
5.2.4. Готовые пластинки	271
5.3. Подготовка пластинок	272
5.3.1. Активация	272
5.3.2. Хранение и очистка	273
5.4. Подвижная фаза	273
5.4.1. Насыщение камеры	274
5.5. Подготовка проб	275
5.6. Нанесение проб	276
5.6.1. Нанесение пробы с помощью капилляра	278
5.6.2. Системы нанесения с регулируемым объемом пробы	279
5.6.3. Контактное нанесение	280
5.6.4. Автоматические устройства для нанесения пробы	281
5.7. Проявление хроматограммы	282
5.7.1. Элюент	283
5.7.2. Типы камер	283
5.7.2.1. Нормальная камера	284
5.7.2.2. Двойная камера	284
5.7.2.3. Камера типа сэндвич (S-камера)	285
5.7.3. Простая хроматография	285

5.7.4. Одномерное многократное разделение	286
5.7.5. Двумерное разделение	286
5.7.6. Камера для автоматического разделения	287
5.7.7. Камера для линейной высокоэффективной тонкослойной хроматографии	288
5.7.8. Инструментальное многократное разделение	289
5.7.9. Планарная хроматография	292
5.7.9.1. Принцип U-камеры	293
5.7.9.2. Особенности кругового разделения	293
5.7.9.3. Принцип мокрого нанесения	294
5.7.10. Антикруговое элюирование	295
5.7.11. Методы с принудительным потоком	296
5.8. Обработка тонкослойной хроматограммы	297
5.8.1. УФ детектирование	298
5.8.2. Детектирование с помощью дериватизации	298
5.8.3. Качественный анализ	299
5.8.4. Разделяющая способность метода ТСХ	301
5.8.5. Количественный анализ	302
5.8.5.1. Визуальное сравнение	302
5.8.5.2. Экстракция	303
5.8.5.3. Спектроскопические методы	304
5.8.6. Методы денситометрии	308
5.8.7. Интегрирование	310
5.8.8. Комбинированные методы	311
5.9. Достоверность результатов ТСХ анализа	312
5.10. Сравнение ТСХ и ВЭЖХ	312
5.11. Выводы и перспективы	315
5.11.1. ТСХ как метод скрининга	316
5.11.2. ТСХ как микроаналитический метод анализа	316
5.11.3. Современные методы разделения	316
5.11.4. Заключение	317
Глава 6. Ионная хроматография	319
6.1. Ион-парная хроматография	320
6.2. Ионообменная хроматография	322
6.2.1. Механизм разделения	323
6.2.2. Химическое подавление	325
6.2.2.1. Двухколоночные системы	326
6.2.2.2. Подавитель с мембраной из пустотелого волокна	328
6.2.2.3. Электрохимическое подавление	330
6.2.3. Электронное подавление	332
6.2.3.1. Анализ анионов	332
6.2.3.2. Анализ катионов	334
6.2.4. Концентрирование пробы в ИХ	335
6.3. Разделение переходных металлов	336

6.3.1. Кислородсодержащие анионы переходных металлов	336
6.3.2. Комплексы переходных металлов	336
6.4. Ионная эксклюзионная хроматография	337
6.5. Возможности детектирования	339
6.5.1. Детектор по электропроводности	339
6.5.1.1. Линейность	339
6.5.1.2. Разрешение	340
6.5.1.3. Фоновый шум	340
6.5.1.4. Температурная компенсация	341
6.5.1.5. Использование детектора проводимости в одноколоночной системе	342
6.5.2. Амперометрический детектор	342
6.5.3. УФ детектирование	344
6.5.3.1. Постколоночная дериватизация	345
6.5.3.2. Косвенная УФ детекция	347
6.5.3.3. Комбинирование ионной хроматографии с оптической эмиссионной спектрометрией и масс-спектрометрией с индукционно-связанной плазмой	348
6.6. Параллельный ионный хроматограф	349
6.7. Колонки для ионообменной хроматографии	350
6.8. Варианты применения	351
6.8.1. ИХ в химии электроэнергетики	352
6.8.2. ИХ в гальванотехнической промышленности	352
6.8.3. ИХ в полупроводниковой промышленности	355
6.8.4. ИХ в пищевой промышленности	356
6.8.5. Другие возможности применения	356
6.9. Выводы и перспективы	357
Глава 7. Капиллярный электрофорез	358
7.1. История и развитие	359
7.2. Физические основы и принцип разделения	360
7.2.1. Электрофорез	362
7.2.2. Электроосмотический поток	363
7.2.3. Процесс разделения	364
7.2.4. Электродисперсия	365
7.3. Различные методы разделения	367
7.3.1. Капиллярный зонный электрофорез	368
7.3.2. Мицеллярная электрокинетическая хроматография	371
7.3.3. Капиллярный гельэлектрофорез	374
7.3.4. Капиллярная изоэлектрофокусировка	375
7.3.5. Капиллярный изотахофорез	376
7.4. Оборудование	378
7.4.1. Ввод пробы	379
7.4.1.1. Гидродинамический ввод	380
7.4.1.2. Электрокинетический ввод	381

7.4.1.3. Методы концентрирования	381
7.4.2. Капилляр	382
7.4.2.1. Кондиционирование	382
7.4.2.2. Термостатирование	383
7.4.2.3. Высоковольтный источник тока	383
7.4.3. Детектирование	383
7.4.3.1. Поглощение в УФ- и видимой области	384
7.4.3.2. Примечания к количественному анализу	386
7.4.3.3. Капилляры с увеличением оптического пути	386
7.4.4. КЭ оборудование	388
7.5. Значение ИХ и КЭ в ионном анализе	389
7.5.1. Примеры использования	391
7.6. Выводы и перспективы	394
7.6.1. Капилляры	395
7.6.2. Детектирование	396
7.6.3. Приложения	397
7.6.4. Новые направления	399
Глава 8. Сверхкритическая флюидная хроматография	400
8.1. Физические основы	400
8.1.1. Что такое сверхкритический флюид?	401
8.1.2. Свойства сверхкритического флюида	402
8.1.3. Сверхкритический флюид как подвижная фаза	402
8.2. Оборудование	403
8.2.1. Градиенты	404
8.3. Подвижные и стационарные фазы	405
8.4. Детекторы	406
8.5. Сравнение СКФХ с ГХ и ВЭЖХ	407
8.6. Применение	409
8.6.1. Полимеры	409
8.6.2. Мономеры	410
8.6.3. Пестициды	411
8.7. Сверхкритическая флюидная экстракция	412
8.7.1. Оборудование	414
8.7.1.1. Системы насосов	415
8.7.1.2. Экстракционные сосуды и печи	416
8.7.1.3. Рестрикторы	416
8.7.1.4. Концентрирование проб	417
8.7.2. Автономная СКФЭ	417
8.7.3. Комбинирование СКФЭ-ГХ	418
8.7.3.1. Динамическая экстракция	420
8.7.3.2. Статическая экстракция	420
8.8. Применения	421
8.9. Выводы и обзор	422
8.9.1. Экстракция сверхкритическими флюидами (СКФЭ)	423

Глава 9. Качество анализа	426
9.1. Достоверность результатов	429
9.2. Условия практики	431
9.3. Обеспечение качеств аналитических определений	432
9.4. Система управления лабораторными данными	437
9.4.1. Интеграция в рамках проектов с применением системы администрирования хроматографической информации	439
9.4.2. Экономичность систем администрирования лабораторной информации	439
9.5. Проблема экологического анализа	441
9.5.1. Экоаудит	443
9.5.2. Методы Агентства защиты окружающей среды	444
9.5.3. Правильный экологический анализ	444
9.5.4. Юридическая строгость решения	445
9.5.5. Проблема отбора проб	446
9.5.6. Заключительные выводы	447
Список фирм	449
Литература	454
Дополнительная литература	466
Список сокращений	469

Предисловие

Инструментальный анализ вследствие успехов в измерительной технике вообще и, в частности, в микроэлектронике пережил в последние 10–20 лет бурное развитие и достиг высокого уровня эффективности. С этими разработками выросли также требования к уровню знаний аналитика как пользователя аналитических методов и технологий. Оптимальное, т.е. проблемно и практически ориентированное использование методов спектроскопии в анализах стало возможным только тогда, когда пользователю известны методические основы, технические возможности устройства, а также границы применения аналитических приборов или аналитических систем.

Доктор Юрген Бёккер, как аналитик, работающий в промышленности, и человек, многие годы преподающий в высшем учебном заведении, представил в своей книге фундаментальный курс, который обсуждает наиболее важные и распространенные методы хроматографии, включая капиллярный электрофорез. Книга, в очень понятной и ориентированной на практику форме, дает представление как о современном состоянии методов и технике анализов, о наиболее важных теоретических основах, так и о деталях аналитических определений и приборно-технического оформления. Каждая глава ведет читателя от физических основ к деталям практического анализа. В его критической оценке преимуществ и недостатков, а также границ методов и приборных технологий эта книга помогает ответственному использованию высокоинструментализованных, снабженных компьютерным программным обеспечением методов анализа для получения надежных и правильных результатов.

С этой книгой аналитику больше не придется быть только слугой «черного ящика», который часто чувствует себя регламентируемым программным обеспечением. Он поймет взаимные связи и, вместе с тем, поймет свой «аналитический инструмент», т.н. «высокоэффективную» технику, и сможет ее оптимально использовать. Я желаю этой книге широкого распространения в надежде, что заложенные Ю. Бёккером основы и обширные детальные знания методик и техники будут способствовать ответственному обращению с инструментальными методами анализа нашего времени.

*Профессор Георг Швед,
Технический университет, Клаусталь*

Предисловие автора

Аналитическая химия с ее традиционным взглядом на качественный и количественный состав веществ является той дисциплиной, которая столетия назад основала химию и сделала ее наукой. С начала этого века синтетическая химия с ее значительными разработками все больше отодвигала на задний план аналитическую химию. Но благодаря революционному развитию и устойчиво растущим потребностям биологии, медицины, материаловедения, техники и экологии аналитическая химия пережила грандиозный подъем. При этом в прошлом остался кризис восприятия, темой которого является отказ от промышленности и, особенно, от химической промышленности. Аналитическая химия быстро становится все более значительным экономическим фактором, который, однако, недостаточно популяризирован. Многие проблемы, например, борьбы против болезней, охраны окружающей среды и экономного обращения с сырьем и энергией могут решаться только с помощью химии. Если раньше аналитика скорее обслуживала другие научные области, то теперь она развилась в самостоятельную дисциплину с растущими потребностями.

Гравиметрия и объемный анализ по природе являются классическими методами классической химии. Бурное развитие электроники и приборных технологий привело к тому, что все больше химических методов анализа заменялось более точными и более быстрыми физическими методами обнаружения и определения. Сегодня химическая аналитика полностью ориентирована на инструментальный анализ. Развитие инструментального анализа в сочетании с электронной обработкой данных не только ускорило ряд прикладных аналитических процессов, но и привело к немыслимым ранее пределам обнаружения. Вместе с тем, время проведения анализов было значительно сокращено. Это, однако, не значит, что дорогостоящие приборы гарантируют успех, но без подходящего инструмента больше ничего не получится. Сегодня особенно широко используются различные спектроскопические методы, как, например, ядерный резонанс, ИК- или масс-спектрометрия, чтобы дать ответ почти на все поставленные вопросы о структуре молекул или качественном и количественном составе материи.

От искусства анализа зависит прогресс в химии и всех более или менее родственных ей дисциплин. С каждым днем нам становится более очевидно, как сильно аналитика способствует технологическому прогрессу. С другой стороны, она также необходима, чтобы узнавать об опасностях для окружающей среды и нашего здоровья и отражать их. Так в целом и общем выглядят очертания применения современной аналитики, которая ускоряет развитие в разных областях науки, промышленности и во всех областях человеческой деятельности в странах с высокой цивилизацией.

Результаты проверки лабораторий являются основой для национальных и международных предписаний и влияют, в том числе, на экономику, здоровье и охрану окружающей среды. Для принятия квалифицированных решений необходимым условием являются надежные результаты измерений, так как ошибочные результаты могут иметь значительные последствия. Поэтому лозунгами аналитики все чаще становятся качество, управление качеством продукции и контроль качества

работы «good laboratory practice» (GLP). При этом требования к аналитике все больше возрастают, однако затраты на проведение анализов не могут увеличиваться из-за сильной конкуренции и возникающего вследствие этого ценового давления. Поэтому, в общем, преследуется цель гарантировать наилучшее качество анализа с минимальными издержками. Это является основанием для глубоких перемен, которые в настоящее время начались в лабораториях. Руководство и сотрудники лаборатории должны все больше и больше рассматривать свою работу с позиций рационализации, продуктивности и производственной экономики. Тенденция к автоматизации и рационализации не исчезает также в инструментальной аналитике. Производители устройств предлагают для этого на рынке все более чувствительные, значительно более быстрые, более точные и очень удобные для пользователя приборы, которые отмечены высокой степенью автоматизации от ввода проб до обработки данных.

Компьютеры с соответствующим программным обеспечением для управления качеством продукции могут помочь в том, чтобы достичь этой цели. Тем временем началась аккредитация лабораторий, условием которой является однозначное управление качеством продукции. Мультимедиа также входит в технику анализов и, вследствие этого, появляется возможность удаленного контроля и обслуживания, которые позволяют осуществлять надзор и управление сложными системами анализов. Всемирные высокоскоростные сети установят глобальный обмен данными.

В то время как деятельность аналитика по существу ограничивалась раньше контролем качества продуктов и установлением структуры новых веществ, сегодня аналитика интегрирована в процесс производства в целом для возможности быстрого вмешательства и оптимизации. Ранее независимые отделы «производства» и «аналитики» должны теперь сотрудничать более тесно, так как оптимизация всех этапов особенно улучшает расчет добавленной стоимости. Тенденции к повышению продуктивности в рутинной аналитике, такие как снижение затрат на анализ, дальнейшая автоматизация, дружелюбие сервисного персонала, взвешенные решения, более быстрые результаты, проверочные средства контроля и постоянная переподготовка, являются только несколькими примерами. Комплексные процессы могут осуществляться автоматизацией очень просто и надежно. При этом аналитик должен работать все с большим набором разных методов, которые удовлетворяют требованиям «ноу-хау». Тенденция методического и технического комбинирования аналитических технологий неуклонно возрастает. С комбинированными технологиями прикладная аналитика сделает значительный шаг вперед. С тех пор как человек начал вести хозяйство промышленным способом, он все больше нагружает окружающую среду выхлопными газами, сточными водами и отбросами. Непереработанные отходы накапливаются в земле, воде и воздухе и раньше или позже попадают в пищевую цепь к человеку. Поиск таких вредных веществ является задачей анализа окружающей среды. Вопросы окружающей среды усиленно рассматриваются с точки зрения цены без того, чтобы видеть там шансы эволюции окружающей среды, экономики и общества. На рынке аналитических услуг по охране окружающей среды в течение последних лет происходят большие изменения, информационные требования для предприятий по-

стоянно возрастают. Удовлетворяющее экологическим требованиям качество продуктов стало фактором конкуренции на международной арене. Из-за растущих обязательств по охране окружающей среды в приборостроении есть тенденция миниатюризации аналитических методов с целью уменьшения потребления.

Все еще очевидное расхождение существует между растущим значением химического анализа и соответствующим учебным предложениям институтов. В Германии аналитическая химия традиционно связана с неорганической химией. Аналитическая химия — это типично прикладная наука. Разнообразие аналитических постановок задач требует высокой доли междисциплинарных совместных работ, которые часто выходят за рамки химии. Аналитическая химия требует собственных специфических знаний, образа мыслей и стратегий. Они начинаются с правильного отбора пробы, свободного от загрязнений обращения и обработки, включают, разумеется, оптимальное инструментальное измерение и заканчиваются оценкой данных и их интерпретацией. Развитие аналитических методов происходит иначе, чем в классических специальностях химии, не только в институтах, но и на приборостроительных фирмах и, кроме того, в промышленных лабораториях.

Аналитические инструменты стали проще, удобнее и меньше. Автоматизированные и компьютеризированные инструменты должны сильно упрощать последовательность анализов для пользователя и делать возможными, вместе с тем, удобство обслуживания благодаря обученным сотрудникам. За недостатком опытного и потому дорогостоящего персонала, а также необходимого времени методы анализов больше не разрабатываются до готовых к применению процессов. Экономии рабочей силы путем ускорения и автоматизации методов сегодня часто как экономическое преимущество ценят выше, чем правильность результатов. Тем не менее, всегда должно оставаться ясным, что окончательная оценка метода и результатов является обязанностью соответствующего пользователя, а компьютер только помогает ему в работе. Для квалифицированных решений на основе стоимости анализов необходимым условием являются надежные результаты измерений. Анализы с высокой надежностью и возможностью глобального сопоставления невозможны без высокообразованных аналитиков.

Эти размышления легли в основу данного учебника. Инструментальным анализом не могут заниматься люди, обслуживающие приборы согласно указанию и не знающие, что они делают. Книга была составлена практиком для прикладного инструментального анализа. Автор в процессе обучения химии работал еще с «классическими» устройствами без компьютеров, и позже в Институте производственной техники и автоматизации им. Фраунгофера (IPA) в Штутгарте построил лабораторию инструментального анализа, работавшую со всеми основными методами необходимыми для исследования и развития области технологии поверхностей. После этого его аналитические знания пригодились при развитии и запуске производства продуктов высоких технологий фирмы IBM.

С 1984 года он преподает инструментальный анализ в области технологии поверхностей и материаловедения в Техническом институте Аалена. Первоначально разрозненные тезисы были объединены в сборник лекций, которые за последние годы постоянно расширялись и дополнялись. Данная книга дает представление о современном состоянии приборной базы и возможности ее применения.

Как аппаратура, так и положенные в ее основу технологии и способы применения инструментальной аналитики являются исключительно успешными инновациями и требуют от всех пользователей заботиться о постоянном расширении и обновлении ранее приобретенных знаний. Цель книги состоит в том, чтобы передать читателю профессионально обоснованное видение в области инструментальной аналитики от основ до новейших разработок. Квалифицированный персонал аналитической лаборатории, студенты специальных высших учебных заведений и обучающиеся химии могут получить обзор различных инструментальных методов анализа и разнообразия поставленных аналитических задач.

Кроме того, обширные и часто сложные положения вещей преподносятся начинающим в этом методе в понятной форме. Поэтому теория ограничена самими необходимым для понимания отдельных методов основами, все общие подходы описываются практически с различными приложениями, преимуществами и возможностями ошибки. Заинтересованный в аналитике ученый знакомится с широкой палитрой различных методов инструментального анализа и получает рекомендации по различной аппаратуре.

Подробные данные об источниках и многочисленные ссылки на литературу позволяют особенно заинтересованному читателю еще глубже проникать в материал.

Ю. Бёккер

ГЛАВА I

ВВЕДЕНИЕ

Аналитические приборы во всем мире являются важными вспомогательными средствами исследования, развития и производства. Сегодня данные анализа могут приводить к определенному беспокойству и даже волнениям в обществе, но во многих случаях именно они позволяют принимать важные для общества решения. Под термином «аналитика» в химии обычно понимают предмет, изучающий состав вещества и методы его определения. Она представляет исходный пункт, с которого начинаются все связанные с оборотом веществ законодательные акты, служащие для обеспечения безопасности и повышения качества нашей жизни. Аналитическая химия является, таким образом, прикладной наукой, которая сегодня больше, чем когда-либо, имеет фундаментальное значение не только в химии, биохимии и химии пищевых продуктов, но и в таких науках, как биология, клиническая химия, геология, материаловедение, экология и контроль окружающей среды и даже физика.

Междисциплинарное значение аналитической химии в нашем современном индустриальном обществе сегодня вряд ли подлежит сомнению. Она необходима как для развития современных технологий, таких как, например, микроэлектроника, сверхпроводимость, так и для обнаружения и минимизации возникающих при этом неизбежных рисков для жизни и окружающей среды. Проникновение аналитики во все более неожиданные области обусловлено кардинальными успехами этой науки, которые она достигла за прошедшие годы, и ведет к дальнейшему распространению и применению высокоспециализированных приборов, которые благодаря использованию микроэлектроники намного проще в употреблении, чем многие методы классической аналитической химии.

Бурное развитие аналитических методов и измерительных технологий, прежде всего в прошедшие двадцать лет, значительно расширило поле деятельности аналитики. Раньше ее деятельность ограничивалась в основном контролем качества продукта и, в незначительной степени, установлением структуры новых веществ. Сегодня, напротив, аналитика является частью процесса производства в целом. К классическим областям контроля качества и структурного анализа добавились, в частности, защита окружающей среды, анализ безопасности, а также научные исследования и опытно-конструкторская деятельность. Токсикологические и аналитические исследования новых веществ и их метаболитов, контроль технологических процессов, анализ следовых количеств веществ и измерение вредных эмиссий стали сегодня рутинными. С расширением области применения за последние сто лет выросли также и затраты на проведение аналитических определений. В то время как оборот в расчете на одного сотрудника в химической промышленности за этот период утроился, стоимость анализа в расчете на одного сотрудника выросла в десять раз. Так, например, на фирме «Байер» первый аналитик в аналитический отдел был принят в 1893 году, а в конце 90-х годов двадца-

того века расходы аналитического отдела фирмы составляли около 500 миллионов марок в год, и в нем было занято около 2500 сотрудников [1.1].

Все приборные аналитические методы базируются на том или ином физико-химическом явлении, из которых два играют в аналитике наиболее важную роль: это использование поглощения и испускания света в спектроскопии и разделение веществ за счет распределения между двумя различными фазами в хроматографии. Все другие методы представляют интерес или для решения только специфических задач, или исключительно для анализа чистых веществ. Разделение смесей путем распределения между двумя различными фазами, из которых одна является неподвижной, а другая — движется (хроматография), имеет важнейшее значение в инструментальном анализе.

Развитие метода хроматографического разделения и инструментального анализа в сочетании с электронной обработкой данных привело, однако, не только к расширению области применения аналитических методов. Пределы обнаружения веществ также смещаются к величинам, которые даже трудно представить. Чувствительность аналитических измерений органических соединений изменилась за последние годы от микрограмма (10^{-6} г) до фемтограмма (10^{-15} г), а в исключительных случаях даже до аттограмма (10^{-18} г).

Если, например, хотят определить в 1 мкг пробы какого-либо элемент, присутствующий в концентрации 1 нг/г (1 ppb), то предел обнаружения должен быть не ниже 10^{-15} г (фемтограмм = fg). Если рассмотреть под этим углом зрения пределы обнаружений обычных методов анализа, то эта цель достижима только в немногих из них и то только с очень большой ошибкой.

От достоверности аналитического метода зависит оценка его экономической эффективности. Если учесть, что на основании аналитических данных порой принимаются очень важные решения, то становится ясно, насколько дорогими могут оказаться на первый взгляд дешевые методы анализа, которые приводят к ошибочным результатам. Систематические ошибки, которые искажают результаты анализов в сторону слишком высокого или слишком низкого содержания вещества в пробе (в противоположность к математически учитываемой статистической погрешности), являются центральной проблемой, например, анализа следовых количеств.

Развитие аналитических методов имеет огромное значение для научных исследований и науки. Все более низкие пределы обнаружения и новые «рекорды» в анализе ультраследовых количеств веществ делают детектируемыми все больше антропогенных веществ в окружающей среде, пищевых продуктах и на рабочем месте. Источники вредных веществ могут быть, таким образом, выявлены и обезврежены. С другой стороны, вследствие все возрастающей эффективности аналитических определений возникает напряженность между химией и общественностью: доказательство того, что какое-то соединение появилось в окружающей среде, общественность часто приравняет, невзирая на концентрации, к реально существующей угрозе человеку и окружающей среде. Это дает питательную среду спорам о вреде химии, которые становятся все более жаркими и эмоциональными. Они, однако, базируются в основном на абсолютных численных данных, величины которых лежат в области нано- и даже пикограммовых количеств и которые трудно себе представить [1.2].

Так, к примеру, все 92 природных элемента издавна являются составной частью нашего мира, нашей пищи и наших тел, только теперь мы знаем также порядок величины, в которой они присутствуют. Ужасное сообщение о том, что в щелуне было найдено 1000 ppm кадмия, теряет свой пугающий характер для тех, кто знает, что это составляет около миллиграмма на тонну и что земная кора содержит в среднем около 300 мг кадмия на тонну [1.3].

Токсикологическая значимость этих аналитических данных для человека и окружающей среды часто упускается при этом из виду. То же самое имеет место и для законодательно установленных норм, которые определяют предельные значения концентраций вредных для здоровья и окружающей среды веществ. Еще Парацельс нашел, что токсичность вещества в первую очередь зависит от дозировки и нет «нулевой нагрузки». Было бы желательно установить и согласовать на международном уровне как токсикологически обоснованные, так и специфические для вещества предельно допустимые концентрации.

Аналитическая химия необходима, когда речь идет о развитии новой технологии и, одновременно, минимизации всех возможных рисков. Предпосылкой является, однако, не только достоверность аналитических данных, но и их правильная интерпретация с учетом, прежде всего, воздействия антропогенных веществ на человека и окружающую среду. Экстраполяции и общие заключения о вредности некоторых веществ, которые являются справедливыми в области высоких и средних концентраций, больше не работают при низких концентрациях. Некритическая корреляция действия некоторых веществ с их концентрацией, прежде всего, благодаря дилетантам, но также из-за дефицита общения, преднамеренных или случайных ошибочных оценок и умаление существующих опасностей учеными нарушили в прошлом доверие общественности к химии.

Аналитическая химия — это источник инноваций и страха. Наиболее сложная ее задача сегодня заключается в том, чтобы донести до общества новые знания из области аналитики. Только так удастся преодолеть страхи и предубеждения. Конечно, учитывая быстрый рост человечества, мы должны беречь наш окружающий мир, нашу землю, полезные ископаемые, воду и воздух. Однако все, кто имеет дело с данными по загрязнению окружающей среды, как аналитики, так и средства массовой информации, выступающие посредниками в работе по связи с общественностью, должны в высокой степени чувствовать свою ответственность [1.4]. Средства массовой информации в полной мере информируют общество в своих докладах о проблематике анализа окружающей среды. Со времени трагедии в Зевезо в 1976 году особенно чувствительна реакция общественности на наличие диоксинов.

Так как все больше решений, принимаемых в политике и экономике, использует данные аналитической химии, широта приложения аналитики будет и дальше усиливаться. Необходимо, однако, понимать, что анализ следовых количеств на практике сталкивается с ограничениями. Даже когда пределы обнаружения аналитического метода вполне достаточны, нужно всегда учитывать целую цепочку возможностей ошибиться, начиная с отбора, транспортировки и подготовки пробы до конечного этапа определения [1.5].

В химическом производстве значение аналитики также растет. Причиной этого является требование к повышению защиты окружающей среды и безопасности, а

также оптимизация потребления реагентов и энергии при одновременном повышении качества продукта. В прошлом химические предприятия сами разрабатывали аналитические методы для производства, так как готовых решений было мало, пока производители аналитических приборов не обнаружили этот быстро растущий рынок. Наряду с разработкой больших приборов, которые иногда работают на пределе своей экономической эффективности, все большее значение приобретают небольшие портативные приборы для проведения анализа непосредственно на месте отбора пробы. В этом случае учитывается не только точность прибора, но и, в большей мере, скорость, с которой могут быть получены надежные данные.

Под инструментальным анализом понимают применение физических методов в аналитической химии. Характерным для внедрения физических методов является то, что в основном результат анализа первоначально получают в форме электронного сигнала. Тем самым эти методы совместимы с последующей обработкой сигнала: измеренные величины можно быстро и автоматически регистрировать, обрабатывать и оценивать. Поскольку инструментальный метод основан на физическом процессе, например, на взаимодействии аналитов и электромагнитного излучения (спектроскопия) или распределения между двумя фазами (хроматография), процессы измерения и подача пробы, как правило, могут быть также автоматизированы.

Быстрое развитие получила автоматизация анализа. С 70-х годов методы обработки данных открыли аналитике новый уровень качества анализа и до сих пор недоступные методические подходы. Успехи, достигнутые за счет внедрения вычислительной техники, можно подразделить на поддержку (англ.: Computer aided) и оптимизацию традиционного анализа и на методы, которые стали возможны только благодаря применению вычислительной техники (англ.: Computer based). К последним принадлежит, например, ИК-Фурье-спектроскопия.

Компьютеризированный анализ достиг, между тем, такого уровня, что лучшего можно и не желать. Компьютер не только регистрирует измеряемый сигнал, он управляет ходом анализа, калибрует прибор (при необходимости) и с помощью меню проводит пользователя по программе. Сегодня пользователь ожидает систему, которая обеспечит ему максимальный результат на всех этапах, начиная с подготовки пробы — этой падчерицы анализа — до удобной обработки данных, сохранения результатов и управления процессом в целом, включая оптимальный выбор метода.

В последнее время внедрение компьютера в инструментальный анализ продолжилось с еще большей скоростью и последствиями и вызвало скрытую революцию, которая проявляет себя во многих областях. Подавляющее большинство приборов управляется одним или несколькими компьютерами, данные непосредственно принимаются системой обработки и результаты достаточно часто выдаются не в виде спектра или хроматограммы, но в виде прямого ответа на поставленный вопрос (что? и сколько?). Это ведет, естественно, к известной отчужденности оператора по отношению к важным процессам внутри прибора, так что внутренний контроль также должен осуществляться компьютером.

Следовало бы действительно однажды задуматься, какие белые пятна были бы сегодня на нашей научной картине мира, если бы не изобрели хроматогра-

фию. Особенно наше знание окружающего мира, биологических процессов и скрытых в них органических соединений было бы для низкомолекулярных соединений настолько же неполным, как это в настоящее время еще имеет место для высокомолекулярных соединений.

Более ста лет известно, что выделение индивидуальных компонентов из сложных смесей является практически единственной возможностью их определения. И только в элементном анализе, благодаря спектроскопическим методам, удается относительно часто это правило нарушить. Все же молекулярная спектроскопия, самостоятельно или совместно с химическими методами разделения, еще должна быть доведена до совершенства, если ее рассматривать как замену хроматографическим методам, что сегодня кажется только утопией.

Что является уникальным и особенным в этом методе? Да то, что впервые для метода разделения решающую роль играет время: как при перемещении пробы, при постоянно обновляемом состоянии квазиравновесия, так и в типе обусловленных диффузией ограничений всех этих процессов. Интересно, что в природе этому трудно найти аналог. Вряд ли другой метод разделения обладает таким широким динамическим диапазоном и сравнительно большой гибкостью, особенно если учесть многочисленные разнообразные возможности детектирования.

Хотя хроматография почти с самого начала является предметом строгой научной интерпретации, она была и остается инструментом, применение которого почти никак не связано с умением или профессиональным образованием. Стоит добавить: в простейшем случае! Экономическую выгоду, полученную с помощью приборов стоимостью 50 000 евро, можно получить в определенных условиях также и с простыми тонкослойными пластинками. Поэтому не стоит удивляться, что хроматография за 30 лет завоевала мир аналитики и, соответственно, была коммерциализована.

Еще совсем недавно аналитики накатывали пластинки для тонкослойной хроматографии, набивали колонки, вытягивали и заполняли капилляры и вычисляли площади пиков с помощью планиметра. Сегодня аналитики покупают изготовленные в промышленности готовые системы, уже укомплектованные всеми необходимыми принадлежностями. Владелец современных приборов не освобождается, однако, от тяжелой подготовительной работы и прочего подобного вмешательства в чисто «инструментальный» процесс. Плохо, если слепое доверие к «черному ящику» ведет к полному отказу от знания разделяющих свойств стационарных фаз и межмолекулярных взаимодействий.

В дальнейшем, конечно, будет также полезно, снова и снова обращаться к области наименьших количеств образцов и наиболее низких концентраций. Здесь хроматография, между прочим, достигла того, что термин «микроанализ», означавший во времена высочайший уровень экспериментального мастерства при обращении с миллиграммовыми количествами пробы, вышел из употребления, или, если сформулировать положительный аспект, стал практически равнозначным понятию «современные аналитические методы». Методы, которые сегодня работают с граммовыми количествами, то есть с относительно большими массами пробы, представляют скорее исключение. Это же справедливо и для спектроскопии, но в особенности — для хроматографии.

Здесь нужно отметить еще один момент, который для технического развития хроматографии имеет большее значение, чем для других аналитических методов: усовершенствование управляющих приборов, колонок, особенно технологии капиллярных колонок, и, не в последнюю очередь, улучшение известных и открытие новых принципов детектирования, прежде всего, для жидкостной хроматографии.

Спрос на аналитические приборы растет во всем мире. В 1990 году оборот отрасли аналитического приборостроения составил 5,1 миллиарда долларов, 40% которых пришлось на США, около 30% – на Западную Европу, 20% – на Японию. Доли рынка распределились следующим образом: 50% – спектроскопия (причем лидером является масс-спектроскопия с оборотом 400 миллионов долларов), затем – хроматография с лидером роста ВЭЖХ¹, приборы для контроля процессов на месте отбора пробы и СКФХ² [1.6].

Мировой оборот для приборов, которые позволяют разделять химические соединения, составляет почти два миллиарда долларов с неуклонным ростом 10% в год. Приборы, используемые для проведения разделений, составляют около 40% мирового оборота всех аналитических приборов. При этом жидкостная хроматография занимает почти две трети всех приборов, используемых для проведения разделения. Эти данные отражают также значение методов разделения в современном промышленном инструментальном анализе. До трех четвертей аналитической работы в промышленных аналитических лабораториях приходится на работу с методами разделения.

1.1. Знание – сила

Решение аналитических проблем с помощью хроматографии, обработка данных и проверка статистической значимости требуют обширных специальных знаний. Потребность в передаче основных методических и технических знаний, также как и в повышении квалификации, очень велика. Такие аналитические методы, как газовая хроматография (ГХ) или жидкостная хроматография (ЖХ), вследствие быстрого развития их инструментальной базы предъявляют высокие требования к их целенаправленному применению. Кроме того, внедрение результатов научного прогресса в повседневную практику иногда не лишено проблем.

Центральной проблемой, которая встречается не только в хроматографии, является вопрос, как представить и объяснить очередное «ноухау» новичку, непрофессионалу или сотруднику, который переквалифицируется. Поэтому профессиональное образование и повышение квалификации приобретают важное значение.

К счастью, здесь есть широкий выбор обучающих курсов. Прежде всего следует назвать курсы повышения квалификации при Объединении химиков Германии (GDCh) и других организациях. Из 19 групп GDCh самой большой является группа аналитической химии, которая насчитывает почти 3000 членов. Она со-

¹ ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

² СКФХ – сверхкритическая флюидная хроматография.

стоит из девяти рабочих подгрупп, что отражает разнообразие методов и вопросов аналитической химии. Наряду с информационным общением внутри профессионального сообщества центральной задачей этой группы является выделение аналитической химии как обособленной дисциплины, не привязанной к неорганической химии, что сложилось исторически, но больше не соответствует действительности [1.7].

Фирмы-производители предлагают вводные курсы по работе с их приборами. На профессионально ориентированных выставках, таких как INCOM, ANALYTICA и АСНЕМА в Германии и конференции и выставке в Питсбурге в США есть информация для профессионалов. Наконец, проводятся национальные и международные симпозиумы в специальных областях. Здесь можно найти обзор состояния исследований и техники в каждой области и обсудить профессиональные проблемы с коллегами.

Стремление к защите окружающей среды изменяет рынки и вводит новые технологии производства. Структура традиционных рынков и методов конкуренции меняется, устраняя токсичные производства. Таким образом, появляются даже новые виды деятельности: в 2000 году в Германии, по мнению экспертов, появилось около 1,1 миллиона рабочих мест для экологов. И все-таки, в деле защиты окружающей среды предпринимателям часто предъявляют чрезмерные требования и заставляют их цепляться за вчерашний уровень техники. Это означает, что они ожидают законодательных решений.

Сегодняшние приоритеты, такие как качество и надежность, не препятствуют, как известно, тому, что продолжают выбрасывать горы мусора и металлолома. Возникающая отсюда угроза биосфере должна быть уменьшена настолько это возможно, для чего аналитика может внести определенный вклад. Так как у производителя, как правило, имеется полная информация о составе исходных и конечных продуктов, то развитие методов анализа отходов может дополнительно внести существенный вклад в дело защиты нашей биосферы от вредных веществ. На основе измененных рамочных условий будущие процессы производства оптимизируют не только для получения продукции, но и для внедрения малоотходных технологий, минимизирующих образование отходов и стимулирующих развитие их вторичного использования.

Наука о составлении экобаланса еще очень молода. Она рассматривает воздействие продуктов и услуг на окружающую среду в течение всего срока их жизни с учетом критериев потребления ресурсов, выбросов и отходов. Это требует хорошо структурированного, объективного и удобного образа действий [1.9]. Кто избегает работы с экологически вредными веществами сегодня, позже сэкономит на экологической безопасности. Первоочередной задачей любого города и всех его жителей является забота об окружающем их жизненном пространстве. Законодательные органы и аналитические службы страны заботятся о том, чтобы уберечь наш мир от дальнейшего загрязнения [1.10].

ГЛАВА 2

ТЕХНИКА ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматография является физико-химическим методом, который может быть использован для разделения веществ. Он может использоваться как в аналитических, так и в препаративных целях, но в основном он служит для идентификации и количественного определения органических и неорганических соединений. В аналитике этот метод часто используют, чтобы выделить и идентифицировать отдельные компоненты. Хроматографию считают сегодня наиболее употребимым и мощным методом, который наилучшим образом подходит для процессов разделения.

2.1. История хроматографии

История хроматографии началась, собственно говоря, еще при Аристотеле, который использовал глинозем для очистки морской воды. Принципы очистки были ему, конечно, не известны. Днем рождения хроматографии считается 21 марта 1903 года. В этот день русский ботаник Михаил Семенович Цвет доложил на биологической секции Варшавского сообщества естественных наук «о новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу». Три года спустя последовали два уточняющих открытия о «физико-химическом изучении адсорбции хлорофиллов» и «Адсорбционный анализ и метод хроматографии, применение к химии хлорофиллов». Наряду со многими другими попытками разделения уже известных красителей Цвет наполнял стеклянную трубку инулином (углевод) и нанес на колонку экстракт хлорофиллов в лигроине. Цвет (1872–1919) писал так:

«Из нижнего конца воронки вытекает сначала бесцветная, потом желтая жидкость (каротин), в то время как в поверхностных слоях инулинового столба возникает интенсивное зеленое кольцо, на нижнем крае которого быстро образуется желтая кайма. При последующем пропускании через инулиновый столб чистого лигроина оба кольца, зеленое и желтое, значительно расширяются и распространяются вниз до известного предела. Как цветные лучи солнечного спектра различные компоненты из смеси пигментов были выделены и могли анализироваться дальше количественно и качественно».

Свой метод Цвет назвал

Хроматография = Запись цвета

и результат, а именно различные цветовые зоны – «хроматограммой». Цвет разделил с помощью своего метода хлорофилл А (зеленый) и хлорофилл Б (желтый) [2.1].

Работы Цвета не получили должного внимания среди профессионалов, и их предали забвению. Хроматография находилась в забвении до начала 30-х годов,

когда к ней вернулась группа Ричарда Куна (1900–1967) в Институте фундаментальной медицины кайзера Вильгельма в Гейдельберге. Речь шла о проблеме разделения смеси окрашенных соединений из ряда каротиноидов или ксантофилов. К рабочей группе принадлежали швейцарский химик Альфред Винтерштайн (1889–1960) и австрийский химик Эдгар Ледерер (1908–1988). Кун был учеником Ричарда Вильштеттера (1872–1942) из Мюнхена, который, как и Цвет, исследовал химию хлорофиллов. За свои исследования, главным образом, хлорофиллов, Вильштеттер получил в 1915 году Нобелевскую премию по химии. Вильштеттер был одержим диссертацией Цвета по хлорофиллам (и хроматографии), переведенной на немецкий язык и изданной в виде книги, и читал ее Куну и его сотрудникам. Ледереру, используя методы хроматографии, описанные в книге, удалось выделить четыре изомера каротиноидов из экстрактов яичного желтка. В 1938 году Кун получил Нобелевскую премию по химии за предложенную Цветом адсорбционную хроматографию каротиноидов и витаминов.

В 1933 году Винтерштайн из группы Куна посетил «лабораторию пищевой химии Данна» в университете Кембриджа и продемонстрировал хроматографическое разделение каротиноидов. Ассистировал ему двадцатитрехлетний инженер-химик Арчер Портер Мартин, который был направлен в эту лабораторию, занимающуюся проблемами питания, чтобы обнаружить витамин Е (токоферол). Почти год спустя Мартин приступил к собственным исследованиям по хроматографии. Он увидел некоторую аналогию:

«Я был околдован сходством хроматографии и дистилляционной колонны. Механизмы разделения каротиноидов и разделение летучих веществ дистилляцией были похожи. Две фазы двигались друг относительно друга, и взаимодействия между ними определяли обмен веществ и их разделение». [2.2]

Ричард Лоуренс Миллингтон Синдж получил стипендию на определение аминокислотной последовательности шерстяного волокна от Международного фонда шерстяной промышленности, деньги которому были предоставлены Австралией, Новой Зеландией и Южной Африкой. Ему в 1938 году в качестве партнера для решения проблем разделения был рекомендован доктор Мартин, которого из-за его окладистой бороды называли «лабораторный Иисус». Мартин помог ему сконструировать противоточный экстрактор с использованием воды и хлороформа. Целью работы было разделить смесь олигопептидов, которые образуются при разрушении протеинов волокна, на составные части, которые можно идентифицировать с тем, чтобы по ним установить исходную последовательность протеинов.

В 1940 году Мартин вернулся в Лидс в научную лабораторию британской шерстяной промышленности, и Синдж, после короткого размышления, последовал за ним, прихватив новую аппаратуру. Позже Синдж писал:

«Пока наша противоточная распределяющая машина работала, мы делили динитрофенилгидразоны альдегидов хроматографически на оксиде магния. Неудовлетворенные работой с хлороформно-водным экстрактором, мы подумали о том, нельзя ли его изменить таким образом, чтобы иметь только одну движущуюся фазу и чтобы при этом проба вводилась в точке подачи подвижной фазы, как при хроматографии».

Идею быстро осуществили: кизельгель, насыщенный водой, представлял собой неподвижную фазу, в то время как хлороформ с небольшой добавкой этанола протекал через колонку в качестве подвижной фазы. Комплексы с метилоранжем в качестве индикатора позволяли наблюдать перемещение аминокислот по стеклянной колонке.

В июне 1941 года Мартин и Синдж доложили результаты своей жидкость-жидкостной распределительной хроматографии Биохимическому сообществу в Лондоне, а 19 ноября 1941 года они отправили в «Biochemical journal» статью: «Новая форма использования двух жидких фаз для хроматографии» [2.3], за которую в 1952 году получили Нобелевскую премию. В работе была также детально представлена теория процесса, которая, по мнению инженера-химика Мартина, находится в тесном родстве с процессом дистилляции. Так была постулирована «Высота, эквивалентная теоретической тарелке» (ВЭТТ), отрезок между двумя воображаемыми площадками, на котором устанавливается распределительное равновесие одного вещества между двумя фазами. ВЭТТ определяет эффективность разделения, и для хроматографии эта величина оказывается равной 20 мкм, что на порядок лучше, чем величина ВЭТТ в 10 мм, находящаяся для дистилляции.

При присуждении Нобелевских премий в 1952 году жюри, кажется, должно было договориться, поскольку как в физике, так и в химии речь шла об аналитических методах. Блох и Пурселл были отмечены за разработку спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), а Мартин и Синдж – за открытие распределительной хроматографии. Оба метода относятся сегодня к наиболее важным методам для разделения смесей химических веществ и, соответственно, для идентификации и структурного анализа вещества (ЯМР). В случае хроматографии научные работы велись уже добрых 10 лет, когда в 1941 году Мартин и Синдж доложили впервые о своем эксперименте по распределительной хроматографии с двумя жидкими фазами.

Исторический экскурс показывает, что Мартин и Синдж только немного опередили конкурентов из Норвегии и Голландии, возможно, потому, что они единственные непременно хотели решить вполне определенную проблему. Из голландской группы в Клинкенберге из лаборатории нефти фирмы Шелл позже был внесен еще один существенный вклад в теорию хроматографии: уравнение Ван-Демтера [2.4].

Основатель хроматографии Цвет в своих теоретических объяснениях представлял процесс разделения в колонке как цепочку селективных актов адсорбции. Тем не менее, в этом он превзошел предшественника, американского исследователя нефти Дэвида Т. Дэя (1889–1925), который, разделив на фракции сырую нефть на колонке с фуллеровой землей, понимал процесс разделения как капиллярную диффузию. В природе образование нефтей различного состава, вероятно, отчасти, также обусловлено хроматографическими процессами, когда нефть перемещается через образования горной породы.

2.1.1. Путь развития

Уже в 1941 году Мартин и Синдж заметили, что подвижная фаза также может быть и паром: «Разделенные летучие вещества должны быть возможными в колонке, в

которой перманентный газ протекает над гелем, пропитанным нелетучим растворителем, пропитанным нелетучей жидкостью, причем разделяемые вещества приближенно подчиняются закону Рауля». Однако первые газовые хроматографы были сконструированы только в 50-е годы, причем снова путеводителем в этом процессе служила совместная статья А. Дж. П. Мартина и Энтони Траффорд Джеймса [2.5].

Мартин и Джеймс использовали для своих первых газовых хроматографов силиконовое масло (с 10%-ной стеариновой кислотой, нанесенной на кизельгур в качестве стационарной фазы). Газом-носителем был азот, пробу наносили с помощью пипетки, прошедшие колонку фракции улавливали в воду и определяли титрованием. Первые коммерческие газовые хроматографы были оснащены детекторами по теплопроводности (катарометрами), пробы вводили через специальную прокладку.

На основе сделанных еще в XIX веке наблюдений, что вещества с разной скоростью мигрируют по фильтровальной бумаге, возникла бумажная хроматография, которая нашла широкое применение. Первые работы по тонкослойной хроматографии были опубликованы в 1938 году Измаиловым и Шрайбером [2.6], но только через двадцать лет метод нашел применение в аналитической химии. В 1956 году свою первую работу по тонкослойной хроматографии опубликовал Шталь.

В отличие, например, от Арнольда О. Бекмана, который начал успешно продавать сконструированный им спектрофотометр в 40-х годах, создав одноименную фирму, пионеры хроматографии, очевидно, не имели коммерческой жилки. Позже они даже отошли от хроматографии. Мартин в 1946 году перешел в Национальный институт медицинских исследований в Лондоне, где в 1950 году начал совместную работу с Джеймсом. В 1956-м Мартин переместился в «другую область» и открыл консалтинговую фирму. С 1964-го по 1974 год он был профессором Технического университета Эндхофена, в 1974-м – профессором химии в университете Хьюстона в Техасе. Сегодня он живет в Швейцарии. Синдж перешел в 1948 году в Исследовательский институт Роветта в Абердине в Шотландии и ушел на пенсию в 1976 году. Он установил аминокислотную последовательность грамицидина S, выделенного Ф. Сэнгером, структуру инсулина расшифровал. Джеймс, родившийся в 1922 году, утверждал, что с 1963-го больше не занимался хроматографией, а только «биохимией липидов».

Эти ученые основали рынок инструментальной хроматографии, который имеет сегодня многомиллионный годовой оборот. К методам колоночной хроматографии еще раньше присоединились бумажная и тонкослойная хроматографии, на которые тоже повлиял Мартин [2.7]. Были сконструированы более чувствительные детекторы, интерфейсы позволили совмещать хроматографию с такими методами идентификации, как масс-спектрометрия и ЯМР. Соединение с системой обработки данных уже не является чем-то особенным. Хроматографическое оборудование можно найти сегодня повсюду, будь то защита окружающей среды, техника управления производством, биохимия, клиническая химия или характеристика полимеров. Количество пробы, необходимое для анализа, становится все меньше и меньше: и в случае капиллярного электрофореза, метода жидкостной хроматографии с «электрическим насосом», достаточно уже нескольких нанограмм.

Формирование теоретических основ хроматографии, таких как разработка лучших материалов для разделения и более чувствительных детекторов, привело в последние годы к созданию современных хроматографических методов:

- капиллярная газовая хроматография (КГХ),
- высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ),
- высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ),
- высокоэффективная ионная хроматография (ВЭИХ),
- сверхкритическая флюидная хроматография (СКФХ) и
- капиллярный электрофорез (КЭ).

То, что работы Цвета не были признаны при его жизни, может иметь различные причины. Когда наука, спустя десять лет, все-таки вернулась к этому полузабытому методу, его значение было полностью осознано. Каррер так писал в 1947 году:

«Никакое другое открытие не оказало на исследования в органической химии такого огромного продолжительного влияния, как анализ с помощью адсорбционной хроматографии Цвета».

Уже давно хроматография не имеет ничего общего с «записью цвета». И Цвет охотно подчеркивал:

«Очевидно, что описанный феномен адсорбции не ограничивается хлорофильными пигментами, но может проявляться по тем же законам для всех классов окрашенных и бесцветных химических соединений».

Название «хроматография» увековечило Цвета, так как в переводе с греческого «*χρόμα*» означает «цвет».

2.2. Принцип

Хроматография является физико-химическим методом разделения веществ, нашедшим аналитическое и препаративное применение. После выделения индивидуальных веществ из смеси их можно охарактеризовать качественно и количественно относительно простыми методами. Для разделения раствор смеси веществ пропускают через твердый, нерастворимый, неорганический или органический материал, который представлен в как можно более измельченной форме, в заданном с помощью прибора направлении. При этом компоненты удерживаются на разных уровнях хроматографического пути. Все хроматографические разделения проводятся в основном по следующей схеме.

Через неподвижную (стационарную) фазу протекает подвижная фаза. Молекулы разделяемых веществ могут находиться в обеих фазах. Эффект разделения основывается на том, что соединения проходят расстояние, на котором происходит разделение, с некоторой, присущей этому соединению, задержкой.

Каждое хроматографическое разделение основывается на различии в скорости миграции компонентов пробы. Разница в скорости является, однако, мнимой, так как собственно перенос вещества осуществляется подвижной фазой, которая движется с постоянной скоростью. Различия появляются из-за разницы времен удерживания соединений стационарной фазой. Хроматографический процесс

состоит из целого ряда процессов сорбции и десорбции, а также растворения и элюирования, которые каждый раз приводят к новому состоянию равновесия.

При этом надо учитывать два предельных случая. В первом из них вещества могут даже не взаимодействовать со стационарной фазой в заданной системе подвижной и стационарной фаз. Вещества не удерживаются стационарной фазой. Эти вещества перемещаются с подвижной фазой, хроматографический процесс разделения не происходит. С другой стороны, существует вероятность того, что вещества могут так прочно связаться на стационарной фазе, что они не будут перемещаться подвижной фазой. Все наблюдаемые хроматографические разделения находятся между этими предельными случаями.

Классификацию хроматографических методов можно провести, учитывая три различных аспекта:

- по агрегатному состоянию подвижной и стационарной фаз,
- по типу процесса разделения,
- по технике проведения.

2.2.1. Классификация по типу агрегатного состояния фаз

Подвижной фазой, которая осуществляет перенос сорбата через хроматографическую колонку, может быть газ или жидкость. Если в качестве подвижной фазы используется газ, то речь идет о газовой хроматографии (ГХ), если жидкость, то хроматографию называют жидкостной (ЖХ). Важнейшее различие состоит в том, что в ГХ рассматриваются только вещества, которые являются летучими, или испаряются при повышении температуры без разложения, или для которых воспроизводимо могут быть получены летучие производные. Только около 20% известных органических соединений могут быть проанализированы с помощью ГХ без предварительной обработки. Для жидкостной хроматографии условием является то, что образец растворим в каком-либо растворителе. Кроме сшитых высокомолекулярных соединений этому критерию отвечают всех органические и ионные неорганические вещества.

2.2.2. Классификация по типу процесса разделения

Когда используют активную твердую основу в качестве стационарной фазы, то обычно говорят об адсорбционной хроматографии. Процесс разделения основывается на том, что вещества с разной силой связываются (адсорбируются) на твердой поверхности и снова растворяются (десорбируются). При транспорте вещества через слой сорбента устанавливается равновесие: пока одна часть соединения адсорбирована на стационарной фазе, другая часть остается растворенной в подвижной фазе. Вследствие большого числа ступеней адсорбции и десорбции уже при небольшой разнице в адсорбционном поведении удается достичь хорошего разделения веществ.

Если на неактивном твердом носителе в качестве стационарной фазы нанесена жидкость, которая не растворяется в подвижной фазе, то говорят о распределительной хроматографии. Молекулы образца распределяются — как при распре-

делении между двумя несмешивающимися жидкостями – между обеими фазами. Чем лучше растворимо вещество в стационарной фазе, тем больше времени оно в ней проводит, тем медленнее мигрирует оно через слой сорбента.

Если в качестве стационарной фазы используется твердый материал с большей активной поверхностью, то, при использовании газа в качестве подвижной фазы, говорят о газоадсорбционной хроматографии (англ.: Gas-solid chromatography, GSC) или, в случае жидкой подвижной фазы, о жидкостноадсорбционной хроматографии (англ.: Liquid-solid chromatography). Если в качестве стационарной фазы используется инертный носитель с большим объемом пор, заполненных жидкостью, то различают, соответственно, газораспределительную (англ.: Gas-liquid chromatography, GLC) и жидкостнораспределительную хроматографии (англ.: Liquid-liquid chromatography, LLC). Различные виды хроматографии представлены в табл. 2.1.

На практике редко происходит разделение веществ только по одному из названных хроматографических принципов. Значительно чаще в разной степени присутствуют различные методы, которые могут также оказывать влияние друг на друга. Как раз в случае адсорбционной хроматографии, где часто используются сорбенты с нанесенными фазами, имеется непрерывный переход от чистой адсорбции к более или менее выраженному распределительному механизму. Точно также в распределительной хроматографии нельзя пренебрегать влиянием материала носителя, на котором находится жидкая фаза, когда поверхность носителя достаточно велика. Правда, говорят, что теория – это когда «все известно и ничего не получается»; практика – это когда «ничего не известно и все работает».

Но истина, очевидно, лежит где-то посередине.

Таблица 2.1. Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз, типам процессов разделения и техникам проведения

Название метода	Английская аббревиатура	Агрегатное состояние подвижной фазы	Агрегатное состояние стационарной фазы	Процесс разделения	Техника проведения разделения
Жидкость-жидкостная хроматография	LLC	жидкое	жидкое	распределение	LC ¹ HPLC ² TLC ³ PC ⁴
Газожидкостная хроматография	GLC	газообразное	жидкое	распределение	GC ⁵
Жидкостная хроматография	LSC	жидкое	твердое	адсорбция	LC HPLC DC, PC
Газовая хроматография	GSC	газообразное	твердое	адсорбция	GC

Примечание.

¹ Жидкостная хроматография (ЖХ, англ.: Liquid chromatography).

² Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, англ.: High performance liquid chromatography).

³ Тонкослойная хроматография (ТСХ, англ.: Thin layer chromatography).

⁴ Бумажная хроматография (англ.: Paper chromatography).

⁵ Газовая хроматография (ГХ, англ.: Gas chromatography).

2.2.3. Классификация по технике проведения

Результатом хроматографического разделения является хроматограмма. Разделяют два вида хроматограмм.

ВНЕШНЯЯ ХРОМАТОГРАММА

Отдельные вещества покидают одно за другим разделительную систему (элюируются) и поступают в детектор, чей сигнал записывают как функцию времени. Это справедливо и для газовой, и жидкостной хроматографии. Слой сорбента, на котором происходит разделение, представлен хроматографической колонкой, поэтому в общем случае говорят также о колоночной хроматографии.

ВНУТРЕННЯЯ ХРОМАТОГРАММА

Разделенные вещества остаются в хроматографической системе и могут здесь определяться. Этот принцип обычно используется в тонкослойной и бумажной хроматографии, когда процесс разделения останавливают, прежде чем подвижная фаза достигнет конца слоя стационарной фазы.

2.3. Теоретические основы

Хроматография является динамическим процессом: транспорт каждого вещества осуществляется исключительно подвижной фазой через слой неподвижной фазы, снижение скорости миграции сорбата происходит за счет его удерживания стационарной фазой. Разделению веществ противодействует диффузия, которая вызывает выравнивание концентраций и, тем самым, повторное смешение веществ. Это означает, что хроматографическое разделение необходимо проводить за столь короткое время, чтобы это повторное смешение за счет диффузии оставалось на минимальном уровне. С другой стороны, подвижная фаза не должна протекать слишком быстро, так как процесс обмена веществ со стационарной фазой требует определенного времени. Для каждой хроматографической системы существует оптимальная скорость потока.

2.3.1. Хроматографический процесс

Мерой склонности вещества к распределению между фазами служит коэффициент распределения $K_{(x)}$:

$$K_{(x)} = \frac{c_{\text{stat}}}{c_{\text{mob}}},$$

где c_{stat} — концентрация (активность) вещества X в стационарной фазе; c_{mob} — концентрация вещества X в подвижной фазе, или фактор емкости k' :

$$k' = \frac{n_{\text{stat}}}{n_{\text{mob}}},$$

где n_{stat} — число молей вещества X в стационарной фазе; n_{mob} — число молей вещества X в подвижной фазе.

Стационарная и подвижная фазы должны, конечно, находиться в тесном контакте друг с другом, чтобы могло установиться равновесие. Для разделения смеси веществ нужно, чтобы различные компоненты в хроматографической системе обладали различными коэффициентами распределения и также различными факторами емкости.

Смесь двух компонентов **1** и **2** наносят на стационарную фазу. **1** находится преимущественно в стационарной фазе, **2** предпочитает подвижную фазу. В этом примере, как видно из рис. 2.1, приняты следующие факторы емкости:

$$k' = 5/2 = 2,5 \text{ и } k' = 2/5 = 0,4.$$

Когда подается свежая порция подвижной фазы, то устанавливается новое равновесие: молекулы образца, которые находились в подвижной фазе, частично адсорбируются на «чистой» поверхности стационарной фазы согласно своим коэффициентам распределения, в то время как адсорбированные молекулы снова переходят в подвижную фазу.

Благодаря многократному повторению этого процесса оба компонента будут разделены. Компонент **2** находится преимущественно в подвижной фазе и мигрирует быстрее компонента **1**, который сильнее удерживается стационарной фазой.

Как видно из рис. 2.1, равновесие устанавливается в этом случае на отрезке пути, длина которого соответствует примерно четырем диаметрам зерна стационарной фазы

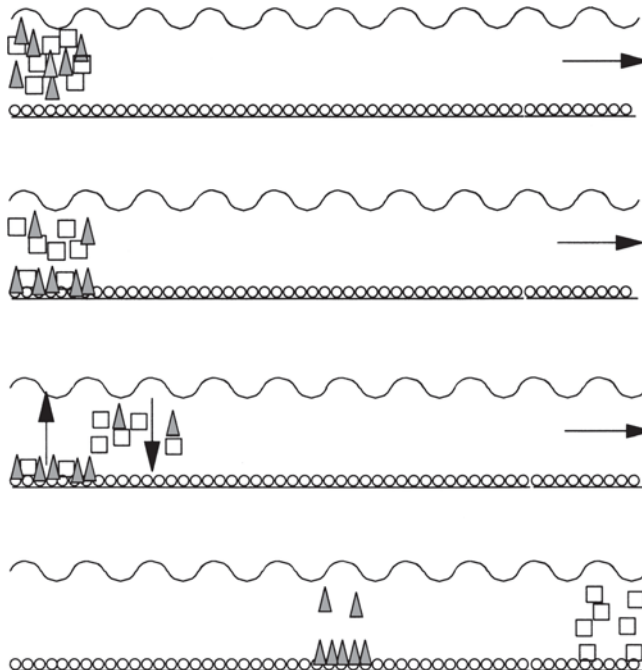


Рис. 2.1. Процесс хроматографического разделения

фазы. Это расстояние составляет, таким образом, одну теоретическую ступень разделения, «тарелку». Чем длиннее хроматографический путь, тем больше он содержит ступеней разделения и тем лучше будет разделение смеси. Этот эффект, однако, частично компенсируется уширением полос. Зоны веществ будут всегда тем шире, чем больший путь прошла проба и чем больше ее время удерживания.

2.3.2. Уширение зон

Уширение хроматографической зоны определяется многими причинами, которые нужно знать, чтобы получить хроматограмму с возможно наименьшей шириной зоны, то есть с наибольшим числом ступеней разделения.

ФАКТОР 1: ПРОДОЛЬНАЯ ДИФфуЗИЯ (РАСSEИВАЮЩАЯ ДИФфуЗИЯ)

Слой стационарной фазы состоит из маленьких частиц сорбента. Сквозь слой стационарной фазы протекает подвижная фаза и переносит молекулы образца. Части молекул «повезло» и они пройдут сквозь слой сорбента быстрее, чем остальные молекулы, так как они случайным образом нашли довольно прямолинейный путь в слое стационарной фазы. Другие молекулы пробы вынуждены проходить более или менее длинные окружные пути, чтобы достичь конца колонки, и будут поэтому элюированы несколько позже, как показано на рис. 2.2.

ФАКТОР 2: РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ПОТОКА

Между частицами стационарной фазы протекает ламинарный поток подвижной фазы. В середине межгранульного канала скорость потока выше, чем вблизи зерна сорбента. Стрелками на рис. 2.3 обозначены векторы скорости подвижной фазы. Чем длиннее стрелки, тем больше локальная скорость потока (рис. 2.3).

ФАКТОР 3: ДИФфуЗИЯ МОЛЕКУЛ ПРОБЫ В ПОДВИЖНОЙ ФАЗЕ

Диффузия – процесс массопереноса, причиной которого является градиент концентраций. Термодинамически необратимая диффузия действует против хрома-

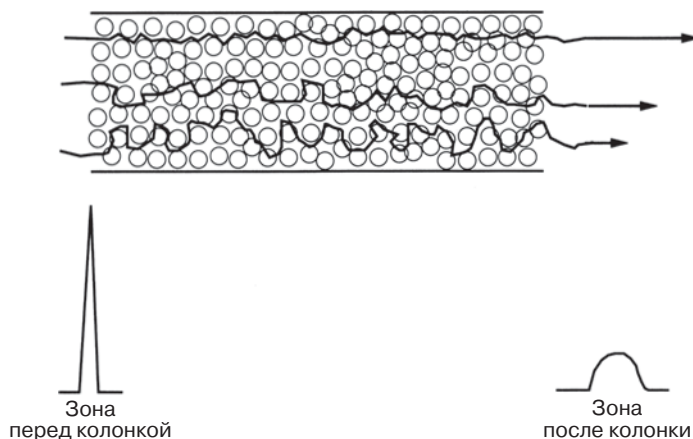


Рис. 2.2. Продольная диффузия в хроматографическом канале

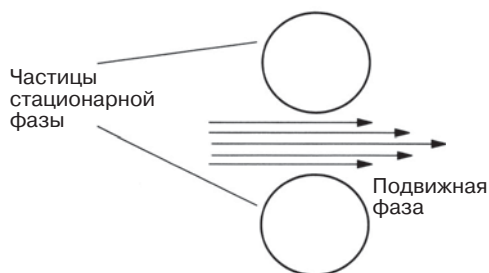


Рис. 2.3. Распределение скоростей потока в хроматографическом канале

тографического разделения. С увеличением времени пребывания молекулы образца в колонке распространяются молекулы в подвижной фазе без какого-либо внешнего воздействия, поскольку они стремятся выровнять концентрацию. Поэтому необходимо, чтобы время проведения хроматографического разделения не было слишком длительным. Этот эффект играет важную роль в газовой хроматографии. В жидкостной хроматографии им часто пренебрегают, так как коэффициент диффузии в жидкостях в 10^4 раз меньше, чем в газах.

Исключительно неблагоприятным для разделения является наличие пустот в упакованном слое стационарной фазы, так как здесь вещества снова могут перемешаться. Этот пустой объем между частицами называют мертвым объемом. Упаковка стационарной фазы, свободная от мертвого объема, является предпосылкой для успешного разделения.

ФАКТОР 4: ДИФфуЗИЯ В ПОРАХ СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЫ

Здесь речь идет об переносе вещества между подвижной, «стационарноподвижной» и стационарной фазами. Рис. 2.4 показывает пористую структуру одной частицы стационарной фазы: в ней есть узкие и широкие каналы, одни проходят насквозь через всю частицу, а другие закрыты. Поры наполнены подвижной фазой,

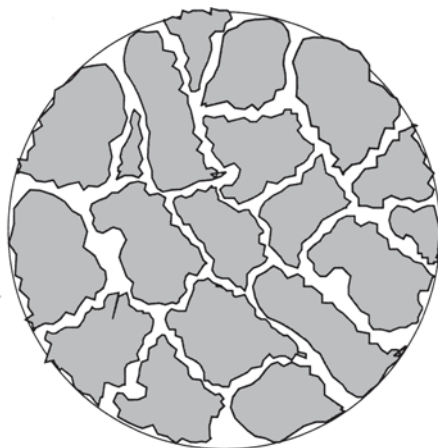


Рис. 2.4. Структура пор стационарной фазы

которая не перемещается, поэтому ее можно назвать «стационарноподвижной». Молекула пробы, которая проникает в пору, не только не переносится дальше потоком подвижной фазы, но меняет свое положение только под действием диффузии.

Уширение полос можно минимизировать следующими методами:

- материал носителя должен иметь, по возможности, более узкое распределение частиц по размерам;
- стационарная фаза должна состоять из мелких частиц или частиц с возможно более тонким пористым поверхностным слоем.

2.4. Колоночная хроматография

В колоночной хроматографии, согласно названию, стационарная фаза находится в колонке. Эта техника применяется в газовой и жидкостной хроматографии. Для получения хроматограммы необходим хроматограф, принцип устройства которого представлен на рис. 2.5. Приведенная схема справедлива как для газовой, так и для жидкостной хроматографии, но составные части в каждом случае значительно отличаются друг от друга и будут более подробно описаны в соответствующих главах. Подвижная фаза в газовой хроматографии называется газом-носителем, а в жидкостной – элюентом.

Транспортная система непрерывно прокачивает подвижную фазу из резервуара через систему разделения, то есть через колонку. Определенное количество пробы вводится на вход делительной колонки с помощью системы отбора и подачи пробы, не прерывая потока подвижной фазы. Подвижная фаза перемещает пробу через стационарную фазу в колонке.

Все трубопроводы и соединяющие детали должны быть по возможности короткими и без мертвых объемов, чтобы предотвратить диффузию разделенных веществ. Разделение пробы на отдельные компоненты происходит в колонке по различным механизмам в зависимости от вида взаимодействия между пробой и стационарной фазой.

Разделенные вещества последовательно покидают колонку и поступают с подвижной фазой в детектор, который переводит концентрацию каждого компонента в электрический сигнал. Этот сигнал может быть затем передан подключенно-

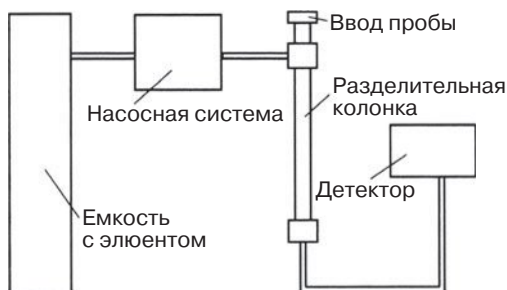


Рис. 2.5. Принципиальная схема хроматографа для колоночной хроматографии

му самописцу, который записывает соответствующую хроматограмму. Сигналы, зарегистрированные самописцем для каждого вещества, называют пиками. Между индивидуальными пиками через детектор проходит только подвижная фаза, которая дает на хроматограмме базовую линию.

2.4.1. Хроматограмма и что она дает

Получаемый в процессе хроматографического разделения пик представляет концентрацию пробы в подвижной фазе на выходе из колонки как функцию времени, и теоретически он может быть описан нормализованной функции распределения. В большинстве случаев наблюдаемая зависимость может быть описана функцией распределения Гаусса, Пуассона или биномиальной функцией. Привлекая дополнительные параметры или функции, можно учесть и асимметрию пика [2.8]. Пики содержат одновременно как качественную, так и количественную информацию об исследуемой смеси.

Качественный анализ: время удерживания одного компонента при одинаковых условиях хроматографии является постоянной величиной. Время удерживания — это время, которое проходит с момента введения пробы до регистрации самописцем максимума сигнала. Условия хроматографии, которые влияют на время удерживания, следующие:

- тип колонки,
- состав подвижной фазы,
- скорость потока подвижной фазы и
- температура.

Качественный анализ, то есть заключение о том, из каких веществ состоит проба, может быть сделано только на основе времен удерживания, если предполагаемые вещества в виде стандартов ввести на колонку и время их удерживания сравнить с временем удерживания пробы. Основной предпосылкой являются, конечно, одинаковые условия хроматографии стандарта и пробы. Может, однако, случиться, что при выбранных условиях хроматографии два совершенно различных вещества имеют одинаковое время удерживания, что может привести к неправильному заключению. Есть две возможности провести достоверный качественный анализ.

И пробу и стандарт хроматографируют два раза в разных хроматографических условиях и сравнивают времена удерживания в первом и втором случаях. При этом маловероятно, что два разных вещества в отличных хроматографических условиях снова покажут одинаковое время удерживания.

Выбирают соответствующие детекторы, которые могут дать дальнейшую информацию о каждом веществе. Эти комбинированные методы будут более подробно описаны в главах о газовой и жидкостной хроматографии.

Количественный анализ: только после качественного анализа, когда вещества идентифицированы с как можно более высокой достоверностью, возможен количественный анализ. Для надежного количественного анализа веществ с помощью хроматографии разделение должно быть проведено, по возможности, до базовой линии. Существуют два способа количественной обработки хроматограмм:



Рис. 2.6. Площадь, соответственно и высота, пика для количественного анализа

в одном случае количество вещества принимается пропорциональным площади пика, в другом случае — высоте пика (рис. 2.6). Если различные стандарты с точно известными концентрациями были введены на колонку, определены соответствующие площади или высоты пиков и построены калибровочные кривые, то затем концентрацию вещества для неизвестной пробы можно определить из площади или высоты его пика.

Какой метод — по площади или по высоте пика — лучше, определенно сказать нельзя. Целесообразно проверить оба метода, чтобы установить, какой из них дает более воспроизводимые результаты. Плохая воспроизводимость результатов в хроматографии обычно указывает на ошибки при введении пробы, детектировании или интегрировании сигнала. На величину сигнала существенное влияние оказывает система подачи подвижной фазы. У концентрационных детекторов площадь сигнала обратно пропорциональна скорости потока.

Для описания удерживания в принципе имеются два разных времени, которые отличаются на величину мертвого времени.

- t_0 : мертвое время колонки — это время, которое необходимо подвижной фазе, чтобы пройти по колонке от места подачи пробы к детектору. Неудерживаемое вещество, то есть вещество, которое не удерживается стационарной фазой, появится на конце колонки спустя время t_0 .
- t_R : время удерживания — это время, за которое анализируемое вещество доходит от места ввода пробы до детектора.
- t'_R : чистое время удерживания — это время, которое равно времени удерживания, уменьшенному на величину мертвого времени. Как видно из рис. 2.7,

$$t_R = t_0 + t'_R,$$

t_0 одинаково для всех элюируемых веществ и является временем их пребывания в подвижной фазе. Разделенные вещества отличаются величинами t'_R , которые яв-

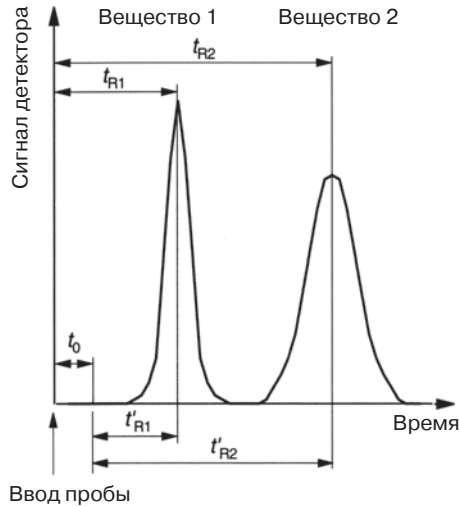


Рис. 2.7. Хроматограмма и ее характеристики

ляются мерой их удерживания стационарной фазой. Чем дольше находится вещество в стационарной фазе, тем позже оно элюируется из колонки.

Время удерживания зависит, конечно, от скорости потока подвижной фазы и длины колонки. Уменьшение скорости подвижной фазы или увеличение длины колонки ведет к увеличению времени t_0 и, тем самым, к увеличению t_R . Поэтому время удерживания не годится для характеристики веществ в хроматографии. Лучше использовать фактор удерживания, обозначаемый как k' и который равен отношению количества вещества в стационарной фазе к количеству вещества в подвижной фазе. Фактор удерживания можно определить также как относительное удерживание и рассчитать из чистого времени удерживания сорбата и мертвого времени колонки:

$$k' = t'_R/t_0 = (t_R - t_0)/t_0,$$

где k' не зависит от длины колонки и скорости потока подвижной фазы.

2.4.2. Теоретические тарелки

Теория тарелок представляет стационарную фазу, состоящую как бы из отдельных участков, каждый из которых соответствует теоретической ступени разделения. Эффективность колонки выражается в этом случае числом теоретических тарелок. Эта величина является мерой разрешающей способности хроматографической колонки. Часто число тарелок относят к длине колонки (в метрах), что позволяет легко сравнивать между собой колонки различных размеров. Это приводит к выражению числа теоретических тарелок на метр длины колонки (число тарелок/метр). Выражения «теоретические тарелки» и «число тарелок» описывают один и тот же параметр; в своих рекомендациях в 1993 году ИЮПАК предложил использовать второй термин.

Когда две колонки с одинаковыми фазами используются в оптимальных условиях, колонка с более высоким числом тарелок на метр обеспечивает лучшее разделение. Близко элюируемые компоненты на одной колонке разделяются до базовой линии, а на другой с такой же фазой и размерами выйдут едва разделенными, если число тарелок на метр для второй колонки будет меньше. Такие отличия эффективностей колонок могут, очевидно, привести к проблемам идентификации и неточному количественному анализу. Еще одна причина в пользу выбора колонок с более высокой разделяющей способностью — это то, что они позволяют достичь более низкой границы обнаружения веществ. Лучшая эффективность ведет к меньшему уширению пиков каждого отдельного компонента. При этом пики получаются более узкими и, вместе с тем, более интенсивными, а соотношение сигнал/шум улучшается.

Выражение «теоретические тарелки» пришло в хроматографию из терминологии ректификации. Технические ректификационные колонны часто содержат ряд реальных тарелок, которые действительно можно сосчитать или которые заполнены «насадкой», чья эффективность может быть выражена через число теоретических тарелок. Колонки наполнены частицами и, разумеется, не содержат тарелок, но и в этом случае можно рассчитать число теоретических тарелок. Чем выше число теоретических тарелок, тем больше эффективность колонки и, вместе с тем, потенциал разделения различных компонентов. Хотя эту величину называют эффективностью колонки, число теоретических тарелок описывает эффективность целой хроматографической системы, включая систему ввода пробы, детектор и, возможно, соединительные элементы.

Число теоретических тарелок, или ступеней разделения N_{th} получается из уширения пиков веществ и времен удерживания и может быть легко вычислено по формуле:

$$N_{th} = 5,54 (t_{R1}/W_h)^2,$$

где t_{R1} — время удерживания стандарта; W_h — ширина пика на половине высоты.

Величина, называемая высотой, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ) h , рассчитывается из соотношения длины l колонки и числа теоретических тарелок N_{th} :

$$h = l / N_{th}.$$

Высота тарелки — это теоретическая величина, описывающая условный участок колонки, на котором устанавливается равновесие распределения молекул хроматографируемого вещества между подвижной и неподвижной фазами. Чем меньше эта величина, тем выше хроматографическое разрешение, которое может обеспечить колонка.

2.4.3. Диаграмма Ван-Деемтера

Число теоретических тарелок зависит от скорости потока U подвижной фазы. Эта зависимость впервые была описана Ван-Деемтером в 1956 году. Она была обнаружена в газовой хроматографии и в общем виде выглядит следующим образом:

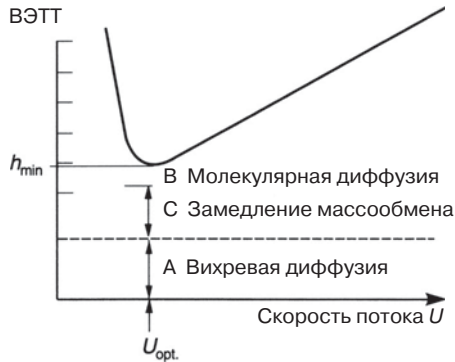


Рис. 2.8. Зависимость ВЭТТ от скорости потока

$$h = A + B/v + C v.$$

Уравнение Ван-Деемтера устанавливает связь с линейной скоростью потока u подвижной фазы в колонке. Каждый коэффициент данного уравнения описывает такие величины, которые оказывают влияние на уширение пиков в колонке. Графическим отображением уравнения Ван-Деемтера является гипербола (рис. 2.8).

Коэффициент A характеризует эффекты размывания, которые наблюдаются при омывании частиц стационарной фазы потоком элюента фазы. Эта вихревая диффузия (или диффузия Эдди) определяется видом материала носителя. A является константой и не зависит от скорости потока. Заметное понижение величины h и, тем самым, улучшение разделяющей способности колонки можно достичь путем уменьшения размера частиц сорбента и повышением гомогенности упаковки стационарной фазы.

Коэффициент B учитывает молекулярную диффузию по длине колонки. B не зависит от размера частиц неподвижной фазы и особенно мал для материалов с неразветвленными порами.

Коэффициент C отражает скорость установления равновесия, то есть перенос вещества между подвижной и стационарной фазами. Эта величина также зависит от размера частиц стационарной фазы. Маленькие частицы способствуют массообмену, тогда как большой размер частиц ухудшает разделяющую способность, причем пропорционально квадрату диаметра частицы.

С помощью уравнения Ван-Деемтера хроматографическая система может быть целенаправленно оптимизирована. Оптимальной скорости потока u , вместе с тем, наименьшему уширению полос соответствует минимум кривой Ван-Деемтера. Коэффициент B в жидкостной хроматографии имеет меньшее значение, чем в газовой, поскольку коэффициенты диффузии в жидкостях меньше, чем в газах. Соответственно, подъем кривой Ван-Деемтера при малых скоростях потока подвижной фазы в газовой хроматографии становится особенно заметным. Новые типы стационарных фаз могут понизить коэффициент A , так, например, в настоящее время проводятся эксперименты с капиллярными колонками и сорбентами очень мелкого зёрнения. Коэффициент C связан с затруднением массообмена в колонке и определяет подъем кривой Ван-Деемтера при высоких скоростях потока

подвижной фазы. Эта константа отражает тот факт, что процессы адсорбции и десорбции требуют определенного времени и при высоких скоростях состояние равновесия не успевает установиться.

Таким образом, три основные причины уширения пиков следующие:

- вихревая диффузия,
- молекулярная диффузия,
- затруднение массообмена.

2.4.4. Аппаратура

Перед тем как перейти к описанию специфических частей газовых и жидкостных хроматографов, можно для обоих типов приборов сформулировать основные требования к их отдельным блокам. Реализация этих требований в этих системах в общем случае различна, так что газовый хроматограф нельзя переделать в жидкостной и наоборот.

2.4.4.1. Система насосов

Хроматография, как и любой физико-химический метод анализа, не является абсолютным методом. Качественное определение вещества осуществляется только по времени удерживания, когда сравнивают в одинаковых хроматографических условиях времени удерживания пробы и стандартов известного состава. Так как время удерживания сильно зависит от скорости потока подвижной фазы, то к системе подачи подвижной фазы предъявляются повышенные требования.

Подвижная фаза должна прокачиваться через хроматограф с высоковпроизводительной скоростью потока, без пульсаций или, в худшем случае, с незначительными пульсациями, особенно при прохождении подвижной фазы через колонку и систему детектирования.

При выполнении этих условий в рутинном анализе не определяют непрерывно фактор удерживания сорбатов, а регистрируют только время удерживания. При длительной эксплуатации хроматографическую систему к тому же регулярно проверяют, хроматографируя смеси известных стандартов. При отклонении времен удерживания и/или количественного определения по площадям или высотам пиков прибор калибруют заново.

2.4.4.2. Ввод пробы

Возможности ввода пробы многообразны и часто являются критической точкой анализа, так как даже лучшие колонки могут дать плохие результаты разделения, когда ввод пробы не соответствует предъявляемым требованиям. Теоретически бесконечно малый объем пробы должен наноситься в центр колонки. Далее необходимо следить за тем, чтобы при вводе пробы в колонку не попал воздух. Проба должна поступить на колонку, не перемешиваясь с подвижной фазой, то есть введенный образец должен быстро и беспрепятственно оказаться непосредственно в начале колонки (on column injection).

Ввод пробы происходит при непрерывном движении подвижной фазы. При этом не следует нарушать давление и скорость потока на колонке. Для оператора оптимальной является возможность легкого изменения объема пробы.

2.4.4.3. Хроматографическая колонка

Сердцем каждого хроматографа является колонка, представляющая собой, как правило, трубку из нержавеющей стали или стекла. Тогда как раньше колонки обычно заполняли вручную сами хроматографисты, сегодня практически исключительно используются готовые колонки, которые гарантированно имеют оптимальное заполнения. Любой мертвый объем в колонке является причиной уширения полос и тем самым причиной ухудшения разрешения хроматограммы.

Предпосылкой для высокой производительности колонки является идеально отполированная внутренняя поверхность. У трубок из нержавеющей стали внутренняя поверхность более или менее шероховатая и исчерченная продольными царапинами, что обусловлено процессом производства. Поэтому стальные трубки должны или высверливаться с высокой точностью или, после обычного получения путем вытягивания, дополнительно полироваться или электрополироваться.

Как материал трубки, так и материал наполнения колонки должны быть химически устойчивы к действию подвижной фазы, чтобы избежать вымывания каких-либо продуктов из колонки. Есть две основных причины разрушения колонок: термическая деструкция и химическая деструкция. Термическая деструкция происходит вследствие нарушения ковалентных связей стационарной фазы при повышенных температурах. Химическое разрушение может происходить под действием агрессивной подвижной фазы или собственно пробы.

Для удержания стационарной фазы в колонку с обоих концов помещают металлические фритты или стеклянную или металлическую вату. С одной стороны, концевые части колонки должны оказывать как можно меньшее сопротивление потоку подвижной фазы, с другой стороны, они должны предотвратить вынос из колонки в детектор мелких частиц, возникающих вследствие неизбежного истирания сорбента и которые могут даже закупорить узкие подводящие капилляры. При подсоединении начала колонки к системе ввода пробы и конца колонки к детектору необходимо избегать любых ненужных мертвых объемов.

2.4.4.4. Детектор

Детектор должен распознавать появление вещества на выходе из колонки. То есть он должен каким-то образом улавливать изменения состава подвижной фазы, преобразовывать это распознавание в электрический сигнал и передавать его самописцу. Самописец в этом случае запишет этот сигнал как отклонение от нулевой или базовой линии.

Хроматографический детектор можно определить следующим образом.

Хроматографический детектор является измерительным инструментом, который фиксирует появление компонентов, отличных от состава подвижной фазы, и который преобразует эту информацию в электрический сигнал.

При этом нужно учитывать, что детектор обладает различной чувствительностью к веществам. Чтобы быть востребованными, детекторы должны удовлетворять определенным требованиям относительно чувствительности, селективности, динамического диапазона, стабильности, объема ячейки и характеристик отклика.

Идеальный детектор должен

- или регистрировать все элюируемые пики с одинаковой чувствительностью (универсальный детектор), или регистрировать только какое-либо определенное, представляющий для нас интерес, вещество (селективный детектор);
- быть нечувствительным к температурным изменениям и изменениям состава подвижной фазы (например, при градиентном элюировании);
- детектировать очень низкие количества вещества (следовый анализ);
- не вызывать уширения пиков и поэтому обладать очень малым объемом рабочей ячейки, обладать быстрым откликом, чтобы правильно регистрировать узкие пики, которые проходят через ячейку за короткое время;
- быть легким в использовании, долговечным и дешевым.

Эти требования, конечно, отчасти утопические, а отчасти взаимоисключающие. Поэтому для характеристики детекторов используют следующие параметры.

СЕЛЕКТИВНОСТЬ

Это мера отклика детектора на различные соединения. Некоторые детекторы быстро реагируют на все соединения, и они обозначаются как универсальные. Другие, наоборот, реагируют только на определенные типы соединений и действительно полезны, когда эти вещества хотят обнаружить в пробе сложного состава. Неселективные детекторы реагируют на общее свойство раствора, проходящего через ячейку. Для определенных физических свойств, как, например, теплопроводность или показатель преломления, детектор «видит» любое изменение и регистрирует каждый пик. Такой детектор не является избирательным. Напротив, УФ-детектор регистрирует только вещества, которые на выбранной длине волны поглощают ультрафиолетовый свет. Этот детектор избирательный.

Мы можем разделить детекторы на три разных класса: универсальные, селективные и специфические.

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ДЕТЕКТОРЫ

Они реагируют на все, что выходит из колонки. Иногда их разумно использовать, но они могут также создавать проблемы. Плохое хроматографическое разделение может помешать детектированию искомого компонента, если детектор регистрирует все, что выходит из колонки. Универсальные детекторы реагируют на вынос стационарной фазы из колонки, а также на малые флуктуации потока подвижной фазы и температуры.

СЕЛЕКТИВНЫЕ ДЕТЕКТОРЫ

Они могут быть элемент- и структурноселективными, а также быть чувствительными к другим свойствам веществ.

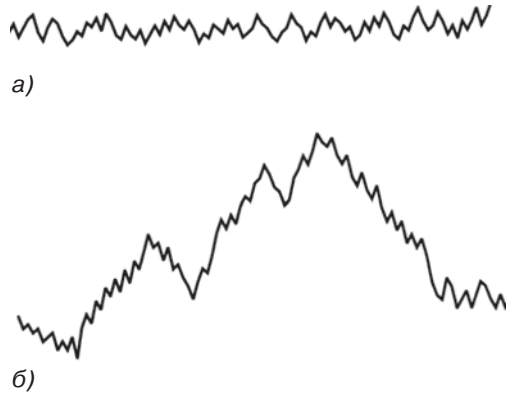


Рис. 2.9. Высоко- и низкочастотный шум

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ДЕТЕКТОРЫ

Они настолько селективны, что могут детектировать определенные структуры или элементы с высокой степенью надежности. Иногда эти детекторы используют для качественного анализа какого-либо вещества. Например, масс-спектрометрия и инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием (ИК-Фурье/МС) обладают высокой специфичностью из-за обширной структурной информации об анализируемом соединении.

ШУМ

При достаточном усилении сигнала детектора видно, что он имеет нестабильную нулевую линию, даже если из колонки не элюируется никакого пика. Высокочастотный шум (рис. 2.9а) может появляться вследствие неудовлетворительного заземления детекторов и/или самописцев, а также электроники усилителя. При хорошем заземлении, а также у более современной электроники шум минимизирован. На высокочастотный шум накладывается низкочастотный (более медленный) шум (рис. 2.9б).

В основном источником этого шума служит подвижная фаза. Однако примеси, пузыри, изменения потока, а также быстрые колебания окружающей температуры также вызывают низкочастотный шум. Причиной шума могут также быть и помехи в электрической сети.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Самый малый измеряемый сигнал не может быть меньше, чем удвоенная высота наиболее интенсивного шумового сигнала. На рис. 2.10 приведен пример для 5 нг вещества. При вводе еще меньшего количества пробы сигнал уже нельзя было бы отличить от шума. Необходимо быть осторожным, если Вы встречаете информацию подобно следующей: «Детектор X может регистрировать даже 1 нг вещества». Количество вещества, которое еще может уловить детектор, зависит от многих факторов, как то: значение k' и время прохождения пробы через детектор.

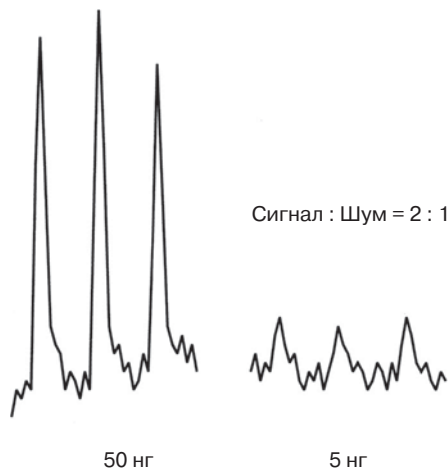


Рис. 2.10. Наименьший детектируемый сигнал

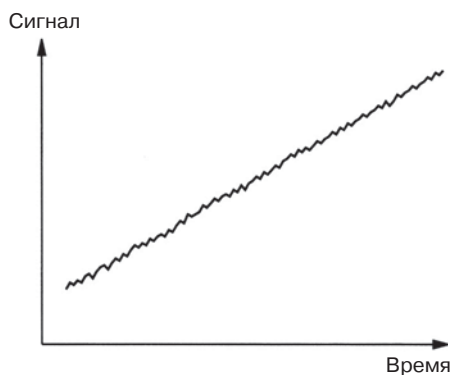


Рис. 2.11. Дрейф

ДРЕЙФ

Под этим термином понимают отклонение нулевой линии, которое регистрирует самописец в виде наклонной линии (рис. 2.11). Дрейф непосредственно после включения хроматографа — явление нормальное. С одной стороны, идет прогрев электроники и ламп до рабочей температуры, с другой стороны, хроматографическая система (подвижная и стационарная фазы) должна прийти в равновесие. Спустя некоторое время после включения всех приборов, особенно насосов, нулевая линия должна выровняться.

ЛИНЕЙНЫЙ ДИАПАЗОН

Сигнал идеального детектора пропорционален соответствующему количеству вещества. Для реального прибора эта линейность, конечно, не бесконечна, но в целом диапазон линейности должен быть как можно шире. Снизу этот диапазон ограничен значением шума при минимальных концентрациях. При высоких концентрациях возникают реальные отклонения от линейности, обусловленные кон-

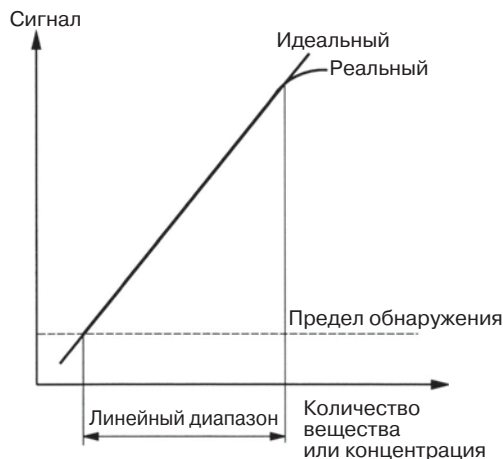


Рис. 2.12. Линейный диапазон детектора

кретным принципом измерения. На рис. 2.12 чем круче подъем прямолинейной зависимости, показанной на рис. 2.12, тем выше отклик детектора на определенное изменение концентрации (англ.: response).

Рабочий линейный диапазон простирается, в зависимости от принципа действия детектора, в общем на несколько порядков. Если определяемая концентрация находится вне этого диапазона, то при слишком высоких концентрациях можно либо уменьшить количество вводимой пробы, либо разбавить пробу, чтобы вернуться в линейный диапазон детектора. При слишком низких концентрациях, то есть ниже предела обнаружения, нужно или повысить количество вводимой пробы, или использовать более чувствительный детектор. Если в обоих случаях вы не достигли желаемой цели, пробу нужно предварительно сконцентрировать.

ПОСТОЯННАЯ ВРЕМЕНИ

Она является мерой того, как быстро детектор регистрирует пик. Так как детектор всегда используют вместе с самописцем или интегратором, представляет интерес постоянная времени комбинации детектор-самописец. Постоянная времени — это время, которое в среднем необходимо системе, чтобы достичь 63% от полной амплитуды. Слишком малая постоянная времени, конечно, увеличивает шум. У лучших детекторов постоянную времени можно выбирать. В частности, в капиллярной газовой хроматографии регистрируются очень быстрые пики.

При выборке величины объема ячейки приходится идти на компромисс. С одной стороны, объем ячейки должен быть не слишком большим, так как это мертвый объем, который вносит вклад в уширение пиков. С другой стороны, слишком маленький объем снижает чувствительность, так как в ячейке для получения сигнала должно быть определенное количество вещества. В ячейке не должно быть мертвого пространства, чтобы пик полностью вымывался поступающим элюентом. Таким образом, объем ячейки должен быть менее 1/10 объема элюирования самых узких (первых) пиков.

ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДЕТЕКТОРОВ

Некоторые детекторы, согласно принципу их действия, разрушают исследуемую пробу, например, сжиганием или электронным ударом. Есть разрушающие и неразрушающие детекторы. Это обстоятельство надо учитывать, если необходимо последовательно соединить в серию несколько детекторов. В этом случае элюент после прохождения через первый детектор направится во второй детектор, который работает на основе другого принципа. При этой технике первый детектор должен быть, конечно, неразрушающим, чтобы второй детектор мог регистрировать неизмененное вещество.

Другой важной характеристикой детектора является зависимость его сигнала от концентрации или массы пробы. В концентрационном детекторе сигнал пропорционален количеству пробы, деленному на объем (ячейки) детектора. В масс-регистрирующем детекторе величина сигнала пропорциональна количеству пробы, прошедшей через детектор за данное время. Соответственно, различают концентрационные и массовые детекторы. Неразрушающие детекторы являются концентрационнозависимыми, тогда как разрушающие детекторы регистрируют массу, так как они продуцируют ионы. Если проба во время детектирования не разрушается, то детектор является концентрационнозависимым, и для него важен объем ячейки.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ДЕТЕКТОРОВ

О пробе можно получить больше информации и таким образом поднять продуктивность анализа, если одновременно использовать несколько детекторов. Этот метод полезен для сложных проб с большими различиями в концентрациях и химических свойств каждого компонента. Чтобы из одной хроматограммы получить как можно больше информации, используется несколько детекторов. На рис. 2.13 показано, что детекторы при этом могут быть включены последовательно или параллельно. Если хотят использовать больше деструктивных детекторов, нужно делить пробу и использовать параллельные детекторы.



Рис. 2.13. Обычные конфигурации мультidetекторных систем

ПОСТКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ

При самых разных проблемах с обнаружением пробы, например, при слишком низкой чувствительности детектора, перекрывании пиков и помехах от матрицы, часто единственной возможностью достичь желаемого результата является модификация сорбата после элюирования их колонки. В этом случае в элюент до входа в детектор через т-образный модуль подается реагент, который с определенным веществом образует специфический и измеряемый с высокой чувствительностью продукт. Для качественной постколоночной модификации важным является быстрое и полное смешение реагента и элюента на возможно более коротком отрезке реактора, чтобы минимизировать уширение пика. Часто также, чтобы в кратчайшее время достичь полного химического превращения, требуется повышенная температура.

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕХНИКА

В основе комбинированной техники лежит идея улучшения аналитических возможностей за счет объединения аналитических методов или отдельных их частей. Прямое совмещение двух независимых аналитических методов в один новый, более мощный комплекс обозначается как «on line» гибридный. Развитие комбинированных аналитических методов представляет комбинация ВЭЖХ и ГХ. Эта техника, введенная К. Гробом, утвердилась в ГХ в форме «on line» твердофазной экстракции при пробоподготовке.

Совмещение хроматографических методов разделения со спектроскопией обеспечивает получение важной информации о каждом элюируемом веществе. Все спектроскопические методы дают информацию о присутствующих соединениях. Однако в то время как для смеси веществ эта информация перекрывается и ее интерпретация затруднительна, предварительное разделение веществ с помощью хроматографии обеспечивает идеальные условия для того, чтобы из спектроскопических данных теперь индивидуальных веществ сделать вывод о присутствующем типе молекул. В этом случае для идентификации вещества хроматографист больше не ограничен исключительно сравнением времен удерживания пробы с известными стандартами.

2.5. Интеграторы

В простейшем случае электрический сигнал проточного детектора может быть обработан с помощью компенсационного самописца, как это типично сегодня для препаративной хроматографии. Ранее пики вырезали с помощью тонких ножниц и взвешивали. У этого метода есть три недостатка для количественного анализа:

- время удерживания определяется недостаточно точно, так как измеряется с помощью сантиметровой линейки. В том случае, когда старт хроматограммы отмечают вручную, возникает погрешность, которая влияет на последующий результат;
- изображение с самописца нельзя обработать. Для количественной обработки слишком маленьких или слишком больших пиков анализ должен быть повторен;
- определение времени удерживания и высоты пика требует много времени. Обсчет аналитических последовательностей может занимать несколько часов.

Поэтому интеграторы как устройства для обработки сигнала являются частью стандартного оборудования современных хроматографов. Интеграторы предлагаются со специальной электроникой для хроматографии, встроенный самопищ регистрирует хроматограмму. Между тем, распространяются также интеграционные системы, которые работают в средах MS-DOS или OS/2 с соответствующими пакетами программ для хроматографии.

2.5.1. Преимущества интеграторов

Существенными являются три преимущества: экономия времени, облегченная идентификация пика и обеспечение точного количественного результата. Все три пункта являются критическими. Распространенная ошибка состоит в том, что многие верят, что интегратор обработку проводит как будто сам и автоматически, а пользователь должен только обобщить результаты. Если бы это было так, то можно было бы обойтись без изображения хроматограммы. Рисунок хроматограммы является, однако, существенным критерием качества анализа. Чтобы можно было оценить результат, который дает интегратор или интеграционная система на компьютерной основе, нужно сначала получить в общих чертах представление о том, как происходит процесс интегрирования.

2.5.2. Процесс интегрирования

Сначала аналоговый сигнал, который поступает с детектора, должен быть преобразован в цифровое значение для последующей обработки. Аналого-цифровое преобразование происходит много раз в секунду, чтобы даже для капиллярных колонок для отдельного пика получить достаточное количество точек. Каждая экспериментальная точка сравнивается с предыдущей и по ним рассчитывается подъем базовой линии. Когда величина подъема превышает предварительно заданную величину, которая является характерной для шума базовой линии, и положительный подъем наблюдается для серии точек, то система констатирует начало пика. Таким же образом при наличии отрицательного подъема (спуск) определяется конец пика. Начало и конец пика в графическом виде обозначают вертикальными линиями — так называемыми интеграционными метками.

Наибольшую проблему при интегрировании представляет, однако, коррекция базовой линии. В простейшем случае между собой соединяют точку в начале и точку в конце пика. Очевидно, что этот метод обеспечивает хороший результат для отдельно стоящих пиков, т.е. при разделении до базовой линии, однако в случае перекрывающихся пиков он приводит к большой ошибке. Несмотря на это интегратор дает даже для таких пиков точные, то есть воспроизводимые, величины площадей. Вероятно, аналитики не всегда задаются вопросом, являются ли правильными и эти величины поверхности. На это вопрос трудно дать ответ, поскольку как интегратору, так и наблюдателю известна только суммарная или огибающая кривая. В таких случаях площадь обычно определяется проведением перпендикуляра: опускают перпендикуляр от минимума между пиками на базовую линию и интегрируют обе части.

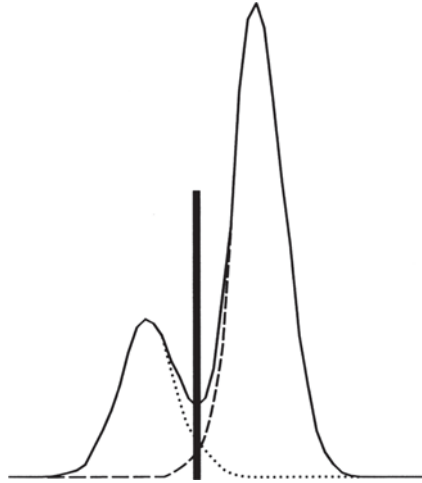


Рис. 2.14. Расчет площади пиков с помощью построения перпендикуляра

Совершаемая при этом ошибка лишь тогда мала, когда соотношение высоты пиков равно 1 : 1 [2.9]. На рис. 2.14 представлены два симметричных (гауссовых) пика с соотношением площадей 1 : 3. Если перпендикуляр проводят в самой низкой точке суммарной кривой, то площадь малого пика оказывается слишком малой, а площадь большого пика — несколько преувеличенной. Интегратор дает соотношение площадей как 0,98 : 3,02. Абсолютный вклад площади, которая вычитается из одного пика и прибавляется к другому, является для обоих пиков одинаковым, но входит в них с разными знаками.

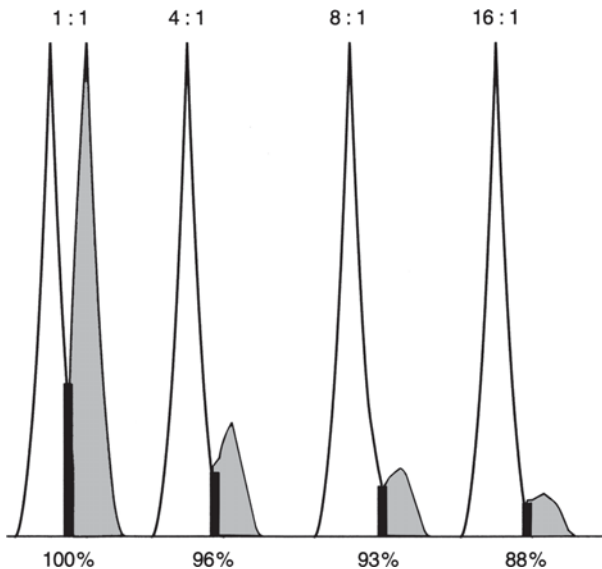


Рис. 2.15. Ошибка при определении площади пика с помощью построения перпендикуляра

При других соотношениях высот пиков площадь пика, определенная этим методом, для более высокого пика будет слишком большой, правда, не более чем на 1%. Для меньшего пика площадь будет слишком маленькой: так, при соотношении высоты пиков 4 : 1 она составляет только 96% истинного значения (рис. 2.15). Для всех методов интегрирования существует возможность исправления базовой линии.

2.5.3. Критерии выбора при приобретении интегратора

Приобретая новый интегратор, нужно обратить внимание на то, что он обладает возможностью показать базовую линию и что у него достаточный объем памяти. Целесообразным является также возможность сохранения хроматограмм на дисках. Интегратор должен иметь возможность внешнего запуска, в противном случае работа с автодозатором не возможна. Система обработки данных, базирующаяся на ПК, несомненно, является более гибкой. Безразлично, используют ли интегратор или интегрирующий компьютер: современное состояние техники дает возможность сохранения большего числа хроматограмм. Это уже само по себе имеет то преимущество, что изображение хроматограммы можно затем изменять. Естественно, что затем можно повторно проводить интегрирование и получить, таким образом, картину влияний условий интегрирования [2.10].

Как уже подчеркивалось выше, единственным критерием оценки хроматографического анализа является только внешний вид хроматограммы. Короткий визуальный осмотр хроматограммы на экране или на бумаге позволяет сделать заключение, хорошо ли прошло разделение, имеют ли ожидаемые пики ожидаемую величину и, таким образом, удался ли анализ или нет. Изображение хроматограммы является, таким образом, одной из важнейшей функций интегратора. Выбранное для изображения усиление, конечно, не влияет на результаты интегрирования. Система с монитором принципиально позволяет увеличивать отдельные части изображения. Эта впечатляющая возможность позволяет, например, лучше различить «плечи» на профиле пика.

Самой важной функцией интегратора является, конечно, интегрирование. Величину площади, представленную интегратором, например, с десятью значащими цифрами, нельзя путать с точностью до десятого знака. Разумно применять только первые три значащие цифры. Интегрирование дает выражение времени удерживания и таблицу площадей пиков. Этот так называемый отчет нужен для того, чтобы произвести качественный или количественный анализ. Интегратор ищет внутри заданного диапазона (окна) пики и в большинстве случаев идентифицирует их в соответствии с ранее данными названиями веществ. Количественной анализ проводится затем по площадям по методу внутреннего или внешнего стандарта. Если окно было установлено неверно, необязательно тратить время на повторную интеграцию. Достаточно заново переработать отчет, в котором задают новое временное окно. Поэтому важно, чтобы файлы с отчетами хранились отдельно. Если результаты количественного анализа могут быть сведены вместе и отчет для серии анализов может быть распечатан в надлежащей форме, то это позволяет сэкономить некоторое количество труда, так как иначе, возможно, пришлось бы делать эту работу даже вручную.

Функцию интегратора необходимо рассматривать критически. При правильном применении, конечно, можно ожидать более точных результатов, чем при ручной обработке результатов. Зато больше вероятность не обнаружить неприемлемые результаты, если не проверять каждый шаг. Интегратор делает анализ, который затем проверяется и корректируется в каждом конкретном случае вручную. При этом компьютеризированные системы, благодаря их потенциальным функциям, являются более универсальными. Только компьютер позволяет интерактивное взаимодействие, позволяющее увидеть влияние изменения данного параметра непосредственно на экране.

Сегодня многие интеграторы оснащены уже возможностью интеграции по двум каналам. Системы обработки данных снабжают почти повсюду двумя, четырьмя и более каналами. Важно, что при этом можно наблюдать обе хроматограммы. Здесь системы с монитором имеют преимущество, так как дают принципиальную возможность наложения (нормированных) хроматограмм. Еще одна возможность, которую часто дает интегрирующая система, это управление переключателями. Эта функция является рациональной только при точном временном управлении. Поэтому разумным является управление переключающими устройствами через интегратор.

Хроматограф, управляемый компьютером, является полностью функциональной и очень гибкой системой. Он удовлетворяет как требованиям исследовательской лаборатории с быстрой сменой заданий, так и требованиям рутинного анализа при контроле качества. Вследствие развития 32-битных компьютеров теперь возможен очень быстрый доступ к данным, а время реагирования компьютера находится в миллисекундном диапазоне. Хранение большого объема данных сегодня больше не проблема. Сохраненные данные различных анализов можно легко и быстро сравнить между собой с помощью графических возможностей сервисной программы [2.11].

Современные операционные системы позволяют решение одновременно нескольких задач и дают гарантию обработки всех данных в соответствии с требованиями системы контроля качества работы (англ.: Good Laboratory Practice, GLP). С помощью подключения системы к компьютерной сети можно достичь ее оптимального использования. Благодаря гибкой сетевой поддержке обеспечивается обмен данными между различными системами, и, таким образом, разработка метода, контроль качества и повседневная рутинная работа оказываются связанными друг с другом [2.12]. С помощью современных операционных систем измерения могут проводиться одновременно с обработкой и распечатыванием ранее полученных данных. Новейшая разработка этой области представляет собой так называемую систему управления хроматографической информацией (англ.: Chromatographic Informations-Managementsysteme, CIMS) [2.13]. Она не только архивирует все поступающие исходные данные, но служит также для оценки метода, для проведения тестов на пригодность системы, расчетов трендов, наблюдения за результатами и их документации.

ГЛАВА 3

ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Впервые газовая хроматография (ГХ) была описана для исследования жидкостей Джеймсом и Мартином (1952). Первый коммерческий газовый хроматограф был введен фирмой Перкин-Элмер (Perkin-Elmer) в 1955 году. После этого метод был использован для исследования продуктов нефтехимии. Высокая эффективность этого быстрого и количественного метода позволила применить его для анализа многих веществ и решения многих задач. Сегодня ГХ принадлежит к наиболее распространенным и, несомненно, наиболее мощным методам исследования в инструментальном анализе.

Газовая хроматография как метод разделения и идентификации сегодня широко используется в лабораториях химической промышленности, исследовательских институтах, а также в клинических исследованиях. Во многих случаях она превратилась в важнейший и наиболее точный метод анализа. Кроме того, во многих случаях этот метод обоснованно претендует на то, что только он может дать исчерпывающий аналитический ответ.

Технику ГХ-анализа всегда сравнивают с ректификацией. Эффективность хроматографических колонок характеризуется числом теоретических тарелок. Числа теоретических тарелок от 250 000 — не редкость для капиллярных колонок.

Хроматограф состоит из следующих частей:

- блок ввода пробы (инжектор),
- пневматическое устройство подачи газа-носителя,
- хроматографическая колонка в термостате с программированием температуры и
- детектор.

Большинство хроматографов на рынке предназначено для анализа жидких проб. «Средний» ГХ прибор обладает инжектором с обогревом, термостатом с программированием температуры, детектором, например, пламенно-ионизационным детектором (ПИД). Напротив, средний хроматограф для анализа газов часто включает необогреваемую систему подачи газа, изотермический термостат для поддержания комнатной температуры или несколько ниже комнатной, а также детектор по теплопроводности. ГХ прибор для анализа жидкостей не подходит без специальной доработки для анализа газов.

Благодаря высокой чувствительности разнообразнейших детекторов могут быть обнаружены даже следы токсических веществ. Сочетание пиролитической капиллярной ГХ с масс-спектрометрией является высокоэффективным методом анализа в химии макромолекул. При контроле производства всеобъемлющий отчет о чистоте веществ получается за несколько минут, и сложное исследование методами «мокрой» химии становится ненужным. Поэтому не удивительно, что хроматография как метод анализа пережила настоящий триумф, так

как она в короткое время позволяет получить исчерпывающую информацию о продукте.

Для этого объема информации необходимо применение компьютеров, а с момента начала широкого использования высокоэффективных капиллярных колонок это является даже необходимым условием сохранения и обработки многочисленных данных. Однако и сегодня проводится большая работа по выяснению основ, законов и возможных ошибок газовой хроматографии [3.1].

3.1. Принцип

В газовой хроматографии подвижной фазой является газ. Стационарной фазой является либо пористое полимерное твердое вещество, либо, в большинстве случаев, жидкость с высокой вязкостью, которая в форме тонкой пленки нанесена на носитель. Материал, на который наносится жидкая фаза, может быть или мелкодисперсным твердым веществом с известным гранулометрическим составом (носитель для заполненных хроматографических колонок) или стеклянным (кварцевым) капилляром. Контролируемый поток (контролируется количество или давление) высокоочищенного газа (газ-носитель) проходит через инжектор в колонку и выходит из ГХ-системы через детектор. Введенная в инжектор проба переносится в колонку потоком газа-носителя. Разделительная колонка находится, как правило, в термостате, обеспечивающем программирование температуры.

Сердцем каждого хроматографа является разделительная колонка независимо от того, используют ли заполненную колонку или капиллярную колонку. В обоих случаях материалом, из которого сделана колонка, может быть металл (предпочтительно, нержавеющей сталь) или стекло. Современные готовые капиллярные колонки сделаны из кварцевого стекла. Разделение веществ происходит за счет многократного повторения процесса распределения каждого компонента между обеими фазами. Поток подвижной фазы обозначается в ГХ как газ-носитель, который движется вдоль жидкой стационарной фазы. Газ-носитель, азот или водород, осуществляет перенос компонентов от устройства ввода пробы к детектору.

Разделение в ГХ основывается на различных эффектах:

- всегда вносит вклад температура кипения пробы;
- следующий важный момент – растворимость вещества в стационарной жидкой фазе;
- существенный вклад в разделение вносит также адсорбция.

Соединения с высоким давлением пара и/или низкой растворимостью удерживаются в жидкой фазе лишь на короткое время. Наоборот, соединения с низким давлением пара и/или более высокой растворимостью медленно элюируются со стационарной фазы.

Транспорт пробы происходит почти исключительно в газовой фазе, а разделение – в стационарной фазе. Качество разделения, то есть разделение отдельных компонентов пробы, зависит от вида и частоты взаимодействий между пробой и стационарной фазой. Это взаимодействие определяется функциональными группами или полярностью пробы и стационарной фазы.

Если мысленно разделить хроматографическую колонку на множество небольших отрезков и представить себе разделение многокомпонентной смеси, то процесс распределения происходит на каждой ступени. Каждое вещество имеет отличное от других время удерживания стационарной фазой. Этот эффект обусловлен молекулярным весом сорбата, формой его молекулы и наличием в его структуре функциональных групп. Даже если времена удерживания отличаются мало, то вещества разделяются благодаря многократному повторению процесса распределения. В результате вещества отделяются друг от друга, и каждое вещество занимает в колонке определенное место. Чем длиннее колонка, тем лучше разделение. Предельная длина колонки определяется сопротивлением потока подвижной фазы, и разделяющая способность растет пропорционально квадратному корню из длины колонки. Отсюда можно сделать вывод, что в колонке для каждого количества пробы должно присутствовать определенное количество стационарной фазы и что, соответственно, нельзя перегружать колонку.

3.2. Система подачи газа

Обычно в качестве газа-носителя используется высокоочищенный азот, поставляемый обычно в стальных баллонах. Если хотят проводить хроматографию высокого разрешения, то к чистоте газа предъявляются особенно высокие требования. Газ-носитель не должен содержать кислород ($<0,1$ ppm). В противном случае при высоких температурах жидкая фаза будет разлагается и время жизни колонки сильно сокращается. Даже следов кислорода, которые диффундируют через малейшие неплотности в резиновых прокладках, достаточно, чтобы вызвать быструю химическую деструкцию стационарной фазы. Эта реакция особенно ускоряется при высокой температуре, что может привести к сильному фону базовой линии.

Следы воды могут легко гидролизовать жидкую фазу. Углеводороды уже в количестве около 1 ppm вызывают сильный дрейф базовой линии, когда используется ПИД. Примеси также привносятся из полимерной мембраны в редукторе или из полимерного шланга. Таким образом, рекомендуется использование специального регулятора давления с металлическими мембранами и металлических подводных капилляров. Совершенно очевидно, что здесь необходим также микропроцессор. Подача газа, до сих пор осуществлявшаяся механическим регулятором, может управляться электроникой. Лишь очень немного приборов использует сегодня игольчатый вентиль как «регулятор подачи газа». Температурный дрейф, которому подвержен также и механический регулятор, устраняют путем термостатирования всего пневматического блока. Известно, что постоянство потока газа позволяет поддерживать в оптимуме как разделяющую способность капиллярной колонки, так и чувствительность детектора, что является необходимым условием ГХ высокого разрешения. На смену механическим регуляторам приходят электронные, снабженные электрическими сенсорами. Эти устройства позволяют электрически регулировать потоки газа-носителя в ГХ и выводить показания на цифровое табло.

Пневматика заботится о том, чтобы в линию поступал поток газа с заданными параметрами. Современные регуляторы потока газа являются диффузионно непро-

нищаемыми и защищают газ-носитель от кислорода. Резиновые мембраны в редукторах проницаемы и, кроме того, они привносят в поток газа значительное количество пластификатора. Кислород при повышенных температурах изменяет полярность фазы, пластификаторы вызывают появление ложных пиков. Свойства высококачественного регулятора давления с металлической мембраной гарантируют количественную воспроизводимость анализа. Газовая хроматография с игольчатым вентилем в системе подачи газа не годится для количественного анализа.

Электронное управление является условием полного контроля газовых хроматографов. Оно открывает также путь к полностью автоматической оптимизации. Оптимизация вручную редко осуществляется в полном объеме, хотя известно, что капиллярные колонки необходимо оптимизировать либо по разделяющей способности (максимум разрешения), либо по максимальной производительности (максимальное число пиков/мин), варьируя скорость потока газа-носителя.

3.2.1. Поток газа-носителя

Поток газа-носителя влияет на скорость переноса веществ по колонке. Эффективность колонки уменьшается при увеличении линейной скорости потока газа-носителя, поскольку ухудшается массообмен между подвижной и стационарной фазами (уширение пиков). С другой стороны, уширение пиков вследствие диффузии компонентов в подвижной фазе уменьшается при высоких скоростях потоков.

Поэтому скорость потока газа-носителя является тем параметром, который необходимо оптимизировать для достижения оптимальных условий работы колонки. Цель оптимизации потока состоит в том, чтобы при данных свойствах колонки, данной температуре колонки и выбранном газе-носителе определить такую скорость потока, которая или обеспечит максимальное число тарелок, не обращая при этом внимание на время проведения анализа, или, при еще максимально возможном разделении, позволит провести анализ в самое короткое время.

У капиллярных колонок скорость потока составляет лишь несколько миллилитров в минуту. Поэтому его измерение на выходе из колонки затруднено. К тому же, в зависимости от условий на выходе колонки находится детектор и/или подаются дополнительные потоки газа.

Простой и доступный метод для определения скорости потока газа-носителя состоит в хроматографировании вещества, которое не взаимодействует со стационарной фазой. По времени удерживания наблюдаемых пиков можно рассчитать как объемную скорость потока в мл/мин, так и среднюю линейную скорость потока в см/с. В качестве летучего компонента рекомендуется использовать, например, метан (его температура кипения $-161,4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для колонок с толстым слоем стационарной фазы при низких температурах взаимодействия могут все же присутствовать. В этом случае определения нужно проводить при повышенных температурах. Следующие уравнения служат для расчета средней линейной скорости газа-носителя:

$$u = l/t_0,$$

где u – средняя линейная скорость газа-носителя; l – длина колонки; t_0 – время удерживания стандарта.

Объемную скорость потока газа-носителя можно найти с помощью следующего уравнения. Она необходима для точного определения отношения деления потока при вводе пробы с делением потока:

$$F = \pi \cdot r^2 \cdot \frac{l}{t_0},$$

где F – объемная скорость потока в мл/мин; r – радиус колонки.

3.2.2. Работа с хроматографическими колонками

Заполненные колонки применяют в сочетании с регуляторами потока, которые позволяют получить постоянный, независимый от сопротивления колонки поток газа-носителя. Использование капиллярных колонок требует регуляторов давления, которые обеспечивают постоянное и не зависящее от вязкости газа давление на входе в колонку. Точную величину объемной скорости потока можно измерить с помощью объемного расходомера на конце колонки при постоянной температуре термостата.

В отличие от заполненных колонок, оптимизация эффективности разделения капиллярных колонок проводится на основе линейной скорости газа-носителя u . Она является важнейшим параметром для достижения оптимальных условий эксплуатации колонки.

Высокая воспроизводимость времен удерживания, также как и стабильность сигнала детектора, зависят от постоянства потока газа-носителя и принципиально достигаются путем добавления регулятора давления или потока.

3.2.2.1. Регулятор давления

Регулятор давления является относительно простым устройством и представлен на рис. 3.1. Он обеспечивает постоянное установившееся давление на выходе, которое, конечно, зависит от давления на входе. Газ поступает в нижнюю камеру и поступает через клапан в верхнюю камеру и далее на выход. Положение клапана контролируется силой, с которой пружина действует на мембрану

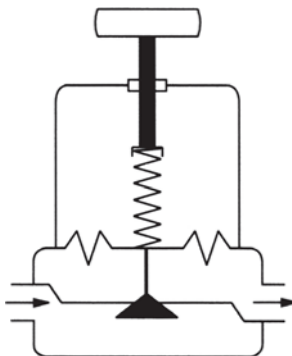


Рис. 3.1. Устройство регулятора давления

и величину которой можно регулировать. Если давление на выходе поднялось выше установленного, то клапан полностью или, соответственно, частично закрывается.

Регулятор этого типа не обеспечивает, однако, равномерного давления на выходе, если непостоянно давление на входе. Это является главной причиной использования на баллонах с газом двухступенчатого редуктора. Давление в полном баллоне составляет от 200 атм, и сначала оно снижается до примерно пяти атм. Эта значение остается постоянным в течение долгого времени, прежде чем давление в баллона с газом упадет ниже этой величины. Регулятор давления применяется при работе с капиллярными колонками. Его, однако, можно эффективно использовать и при работе с заполненными колонками.

3.2.2.2. Регулятор потока

Изменение объемного потока в процессе хроматографии может быть компенсировано регулятором давления. Объемный поток изменяется, например, при повышении температуры термостата, так как вязкость газа повышается и тем самым увеличивается сопротивление колонки. Постоянный поток все же необходим при работе с заполненными колонками и с капиллярными колонками большого диаметра. В этом случае используют регулятор потока.

Пружина держит внутренний клапан открытым, пока к мембране приложено определенное давление. Когда давление газа повышается, клапан сначала закрывается, поскольку повышается давление и на мембране. Если игольчатый клапан открывается, то газ поступает также в среднюю камеру. Когда давление газа превысит давление, приложенное к пружине, внутренний клапан опять открывается и постоянный поток газа поступает на выход (рис. 3.2).

Регуляторы потока применяются главным образом при проведении анализов на заполненных колонках и капиллярных колонках большого диаметра в режиме программирования температуры. Если температура термостата возрастает, то увеличиваются также вязкость газа и тем самым сопротивление колонки. Регулятор потока обеспечивает постоянный объемный поток тем, что он соответственно изменяет давление на входе в колонку. Постоянный объемный поток в первую очередь имеет большое значение для детекторов, так как иначе появляется дрейф базовой линии и непостоянство отклика детектора.

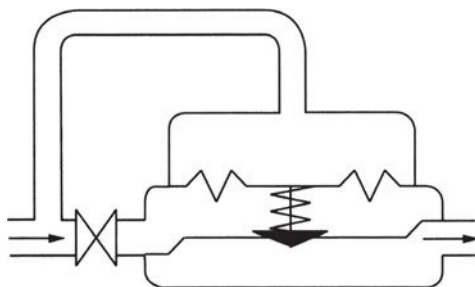


Рис. 3.2. Устройство регуляторов потока

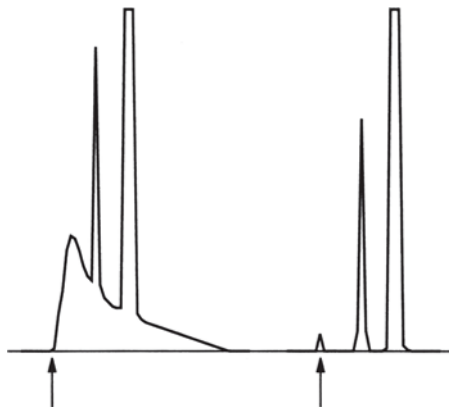


Рис. 3.3. Искажение сигнала детектора вследствие пульсации давления при вводе газовой пробы

Регулятор потока обладает все же некоторыми недостатками:

- игольчатый вентиль в регуляторе подвержен сильному влиянию температуры и поэтому должен термостатироваться;
- любая, даже небольшая неплотность не будет учитываться регулятором, так что объемный поток будет делиться между колонкой и неплотностью, что приведет к уменьшению потока через колонку;
- реакция такого регулятора является относительно медленной. В анализе газов очень важно, чтобы возникающая при подаче пробы в поток газа-носителя пульсация давления быстро выравнивалась. С медленным регулятором потока это невозможно, что приводит к искажению формы сигнала детектора.

Регулятор давления реагирует намного быстрее и поэтому у него этот недостаток не наблюдается. Этот эффект показан на рис. 3.3.

В системах с переключением колонок часто появляются значительные перепады давления, к примеру, при отключении колонки или подключении обходного капилляра (bypass). Эти помехи можно уменьшить, если для выравнивания давления использовать регулятор давления и игольчатый вентиль (рестрикторы).

3.3. Колонки для газовой хроматографии

Как уже упоминалось вначале, разделяющие колонки являются сердцем газового хроматографа. Здесь компоненты пробы разделяются соответственно полярности и разделяющей способности колонки. Существуют самые различные типы колонок, чтобы удовлетворить изменяющиеся требования анализа. Общими характеристиками хороших хроматографических колонок являются:

- хороший массообмен между подвижной и стационарной фазами,
- высокая проницаемость, то есть низкий перепад давления для данного потока газа-носителя,
- высокая емкость колонки,

- широкий температурный интервал применения, то есть возможность работы при высоких температурах.

На практике применяются два совершенно разных типа разделительных колонок:

- заполненные колонки и
- капиллярные колонки.

В современной газовой хроматографии используют почти исключительно капиллярные колонки. Даже ряд критических разделений, таких как препаративная газовая хроматография, может проводиться на капиллярных колонках после появления колонок сверхбольшого диаметра (англ. «Megabore»).

Возросшие требования к пределам обнаружения веществ, так же как и требования к разделению изомеров, например, при анализе ПХБ (полихлорбензолов) или диоксинов, могут быть выполнены только на капиллярных колонках. К сожалению, это обстоятельство еще не получило повсеместного признания, например, в области законодательно регламентированных анализов, где и сегодня еще многие аналитические методы американской службы защиты окружающей среды основываются на применении наполненных колонок.

3.3.1. Наполненные колонки

Сорбент, который наряду с большой поверхностью должен быть не слишком мелкозернистым и иметь, по возможности, однородное распределение частиц по размерам, заполняют в трубки из нержавеющей стали или стекла с диаметром внутреннего сечения от 1 до 5 мм и длиной от 0,5 до 10 м таким образом, чтобы наполнение получилась гомогенным и при этом не происходило разрушения частиц. Диаметр частиц пористого сорбента лежит обычно между 50 и 500 мкм. С уменьшением диаметра частиц возрастает сопротивление потоку подвижной фазы на колонке. Чтобы получить эффективные колонки и в то же время избежать слишком большого противодействия, преимущественно используются узкие фракции сорбентов зернением между 100 и 300 мкм.

Пористый материал обладает большой поверхностью, разделение на которой происходит либо непосредственно благодаря молекулярно-ситовому механизму, либо вследствие межмолекулярных взаимодействий со стационарной фазой, нанесенной на эту поверхность. Количество стационарной фазы составляет обычно от 0,5 до 25% веса адсорбента. Это количество значительно больше количества, наносимого на капиллярную колонку. Поэтому на наполненные колонки можно наносить большие объемы пробы, так как в колонке находится соответственно большее количество стационарной фазы. Поэтому эти колонки, вследствие более сильного удерживания соответствующих компонентов, обладают хорошей разделяющей способностью по отношению к газам и парам. Равным образом, при анализе побочных компонентов, преимуществом этих колонок может быть их высокая нагрузочная емкость.

С другой стороны наполненные колонки обладают рядом недостатков при исследовании компонентов с высокими точками кипения. Проницаемость на-

полненных колонок очень низкая. Поэтому для установления оптимального потока газа придется мириться с большими перепадами давления, особенно при длинах колонок более 5 м. Тем не менее число теоретических тарелок у этих колонок может быть довольно высоким, особенно при использовании сорбентов с малым размером частиц.

Ввод пробы для заполненных колонок относительно прост, так как из-за высокой нагрузочной емкости они могут делить с хорошей эффективностью большие количества пробы. При этом нет необходимости в применении сплит-инжекторов.

Высота теоретической тарелки растет вместе с ростом диаметра колонки. Это снижение эффективности разделения может быть компенсировано путем увеличения длины колонки. Для длинных колонок необходимо использовать высокое давление на входе в колонку. Сильный перепад давления на колонке приводит к тому, что вследствие сжимаемости газа-носителя только в небольшой части колонки соблюдается оптимальная скорость потока, из-за чего разделяющая способность колонки снова ухудшается.

Как правило, лишь небольшое число веществ соответствует требованиям разделения на наполненной колонке. В то же время она проще в применении при количественных определениях, а также, благодаря малому мертвому времени, она обеспечивает более быстрый результат, так что значение набивных колонок в последнее время снова возросло. Чаще всего, из-за простоты обращения с ними, используются колонки из нержавеющей стали. Если проба сильно полярна, то в некоторых случаях не избежать применения стеклянных колонок несмотря на то, что они после изготовления не могут изгибаться и их установка в хроматограф требует определенного навыка. Колонка, чтобы она легко устанавливалась в термостате ГХ, закручена в спираль уже перед заполнением сорбентом, хотя это и затрудняет процедуру наполнения.

Так как хроматография начиналась с наполненных колонок, существует богатый опыт их применения и большое число продуктов для работы с ними. В качестве твердых адсорбентов для газового анализа используют, например, активированный уголь и окись алюминия. С давних пор на рынке появились также молекулярные сита, которые позволяют проводить очень специфические разделения. Графитизированный углерод имеет поры определенных размеров. Часто использовались и природные сорбенты, такие как диатомовая земля (кизельгур). Его свойства, однако, не обеспечивают эффективного разделения.

Высокой эффективности удастся достичь при использовании сорбентов с большой поверхностью и однородной структурой пор. Размывание пиков, вследствие неоднородности потока, меньше для частиц однородной формы и размера. Сорбенты должны обладать механической прочностью и устойчивостью к разрушению и быть инертными по отношению к пробе.

В соответствии с этими требованиями был разработан ряд носителей. Хорошие носители не должны слишком сильно сорбировать компоненты пробы на поверхности частиц. Полярность стационарной фазы в этом случае будет определяться только полярностью стационарной жидкой фазы. Для каждого анализа подыскивается определенный носитель и покрывается жидкой фазой, которая в

значительной мере подавляет адсорбцию на поверхности носителя, и разделение происходит только на основании разделяющих свойств жидкой фазы. В настоящее время есть синтетические материалы, которые удовлетворяют всем приведенным выше требованиям. Их однородные по размерам частицы имеют сферическую форму. Механическая прочность позволяет им противостоять истиранию, а инертная однородная пористая структура обеспечивает равномерное нанесение разделяющей фазы.

3.3.2. Капиллярные колонки

Этот тип колонок очень популярен благодаря почти универсальной применимости и выдающимся разделяющим способностям. Желание достичь большей эффективности разделения не может быть реализовано путем увеличения длины наполненных колонок. Этому препятствует возрастание сопротивления потоку подвижной фазы. М. Дж. Голей представил в 1957 году свои капиллярные колонки и запатентовал их [3.3]. Развитие капиллярной хроматографии привело к замещению металлических капилляров капиллярами из кварцевого стекла. Длина капилляров составляет от 10 до 200 м и диаметр внутреннего сечения – от 0,1 до 0,5 мм. Они не наполнены, не содержат сорбент во всем внутреннем пространстве капилляра, а стационарная фаза нанесена тонким слоем (пленкой) на внутренние стенки капилляров. Благодаря тому, что колонка полая, она, даже при длине более 100 м, требует лишь небольшой перепад давлений для своей работы. Благодаря такой высокой проницаемости при длине даже свыше 100 м перепад давлений в 1–2 атм достаточен для достижения оптимального потока газа-носителя. Существенное преимущество открытых капиллярных колонок состоит в значительном уменьшении высоты теоретической тарелки согласно уравнению Ван-Деемтера, поскольку:

Вследствие отсутствия сорбента вихревая диффузия стремится к нулю.

В случае PLOT капиллярных колонок (от англ. полый капилляр с пористыми стенками) речь идет о капиллярах, внутренняя поверхность которых в качестве разделяющей фазы вместо жидкости покрыта слоем твердого пористого адсорбента. Таким образом, речь идет о газоадсорбционной хроматографии. Разделение происходит благодаря адсорбции и молекулярной эксклюзии [3.4]. Стационарная фаза имеет толщину пленки от 0,05 до 10 мкм, и ее величина сильно зависит от диаметра внутреннего сечения капилляра. При малой толщине пленок сильно понижается предельно допустимая нагрузка колонок этого типа, хотя, тем не менее, компоненты с высокими температурами кипения обладают короткими временами удерживания. В любом случае, остается невыгодной малая допустимая нагрузка этих колонок, которая делает необходимым применение специальных систем ввода пробы. При подаче на капилляр количества пробы большего, чем позволяет емкость, происходит перегрузка колонки; что приводит к деформации пиков.

Для получения гомогенных пленок, прочно связанных с поверхностью капилляра, перед нанесением жидкой стационарной фазы проводят обработку поверх-

ности, например, травление или нанесение вспомогательного полимерного слоя. Изготовление капилляров — трудоемкий и длительный процесс, поэтому их получают в промышленных масштабах и приобретают уже в готовом виде. Ряд стационарных фаз доступен в виде так называемых пришитых фаз. Это значит, что фаза пришита химической связью к поверхности кварцевого стекла. Преимуществом этой колонки является высокая термическая устойчивость, также как возможность промывать колонку при сильном загрязнении органическими растворителями.

Когда аналитический метод старится и теряет быллой блеск, начинается, как правило, его широкое коммерческое использование. В конкретном случае капиллярной газовой хроматографии прошло почти двадцать лет до того момента, когда коммерческие капиллярные колонки подходящего качества также стали доступны. Замена производимых в лабораторном масштабе капиллярных колонок на коммерческие произошла в конце семидесятых годов [3.5].

Капиллярная газовая хроматография перестала быть одним из специальных приемов и превратилась в ведущий хроматографический метод, научное понимание которого основывается на все более прочном фундаменте. Все же хрупкость колонок и почти полная невозможность встроить их в ГХ приборы старых моделей помешали их быстрому внедрению в аналитические лаборатории. Путь к их массовому применению был открыт, только когда были построены приборы специально для работы со стеклянными (кварцевыми) колонками.

Исследования химии стекла очень упростили дезактивацию поверхности стекла и нанесение разделяющей фазы. Так что вряд ли сегодня есть какая-то фаза, которую нельзя нанести в виде гомогенной пленки. Недостатком так называемых WCOT колонок (открытые капиллярные колонки со слоем стационарной фазы на внутренних стенках, от англ.: wall-coated open tubular column) является малое количество стационарной фазы на внутренних стенках капилляра. Этот недостаток можно устранить, используя SCOT колонки (открытые капиллярные колонки с твердым носителем на стенках, от англ.: support-coated open tubular column) (рис. 3.4). В этих колонках на внутренней части капилляра нанесены дополнительные слои носителя с подходящим мелким размером зерна, которые насыща-

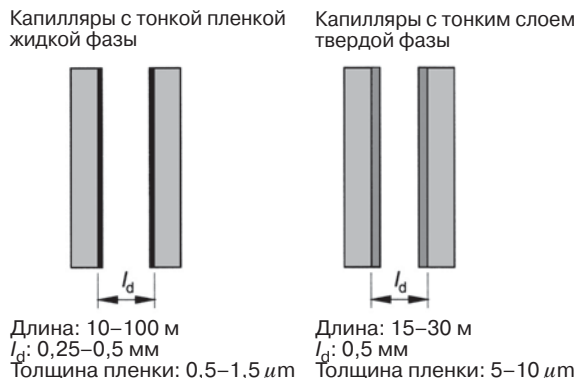


Рис. 3.4. Сравнение капиллярных колонок с тонкой пленкой (WCOT) и тонким слоем (SCOT) стационарной фазы

ются стационарной фазой. Эти колонки легко получить, и они обладают хорошей воспроизводимостью разделяющих свойств, но WCOT колонки имеют более широкую область применения [3.6].

Все стеклянные капиллярные колонки, используемые в семидесятых годах, обладали тем недостатком, что содержали катионы. При более высокой температуре они реагировали как основания и вызывали гидролиз сорбатов. Наиболее важным нововведением последнего времени в этой области стало, несомненно, внедрение в качестве материала колонки наряду с обычными щелочными и борсиликатными стеклами «плавленого кварца», ПК («fused silica», FS). Плавленый оксид кремния SiO_2 является инертным материалом, наружная поверхность кварцевого капилляра покрыта слоем полиимида. Полиимидное покрытие предотвращает разрушение хрупкого материала колонки. Тонкостенные ПК-капилляры обладают большой механической гибкостью и могут быть поэтому легко встроены в приборы с неподходящей геометрией. Из-за полиимидного покрытия они устойчивы до температур $\sim 350^\circ\text{C}$.

Процесс хроматографического разделения должен происходить исключительно при взаимодействии со стационарной фазой, а не с материалом колонки, который является лишь носителем стационарной фазы. Поэтому внутренние стенки колонки должны быть дезактивированы. Высокая степень чистоты используемого оксида кремния позволяет получать каталитически неактивные поверхности. Дезактивация поверхности колонки необходима потому, что жидкие стационарные фазы при повышенных температурах колонки, особенно в присутствии щелочей, могут разрушаться, а на поверхности колонки может иметь место необратимая адсорбция сильнополярных веществ. Поверхность плавленого кварца или уже является малоадсорбционной даже и для полярных соединений, или может быть легко дезактивирована с помощью специальной обработки.

3.3.2.1. Фазовое отношение

Сегодня доступны капиллярные колонки с широким выбором внутреннего диаметра I_d , длины l , типа стационарной фазы и толщины пленок d_f . В качестве вспомогательного средства для характеристики и выбора оптимальных размеров разделительных колонок можно использовать фазовое соотношение β . Распределение фаз является безразмерной величиной, которая рассчитывается из величин внутреннего диаметра капилляра и толщины пленки. Соответственно, β равно отношению объема газа-носителя в колонке к объему стационарной фазы. На рис. 3.5 схематически показано строение капиллярной колонки.

Фазовое отношение β является полезной вспомогательной величиной при выборе разделительных колонок, так как колонки с равными β в одинаковых условиях анализа и с одинаковыми стационарными фазами обладают почти идентичными относительными временами удерживания. Это означает, что колонки с разной толщиной пленок и диаметрами внутреннего сечения при одинаковых значениях β взаимозаменяемы.

Величины β рассчитывается из следующего выражения:

$$\beta = 0,5 I_d / 2 d_f$$

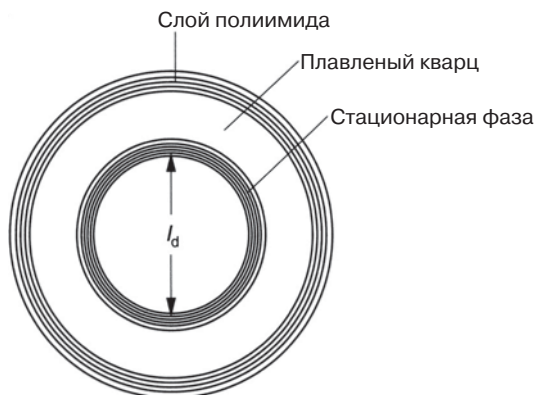


Рис. 3.5. Сечение капиллярной колонки

При постановке определенной задачи это дает возможность правильно выбрать колонку. Например, если нужно повысить емкость колонки, то этого можно достичь, используя колонку большего внутреннего диаметра и соответственно с более толстой пленкой стационарной фазы. Для увеличения эффективности разделения, наоборот, выбирают колонку с меньшим диаметром внутреннего сечения и, соответственно, более тонкой пленкой. В обоих случаях величина β и характеристики разделения остаются постоянными.

3.3.3. Выбор колонки

В настоящее время в обращении имеется около 500 различных хроматографических фаз. Неправильный выбор особенно часто делают начинающие хроматографисты, если у них нет в распоряжении подробной информации о свойствах стационарной фазы или соответствующего литературного руководства. Опыт показал, что 90% всех проблем разделения, встречающихся в обычной лабораторной практике газовой хроматографии, можно решить с помощью пяти стационарных жидких фаз разной полярности. Благодаря высокой разделяющей способности современных хорошо дезактивированных капиллярных колонок в большинстве случаев можно уже не использовать различия в селективности. Смена полярности всегда рекомендуется в том случае, если хорошее разделение удастся достичь лишь при длительном времени анализа [3.3].

Из широкого ряда предлагаемых хроматографических фаз примерно 30 используются особенно часто. При этом определенные фазы имеют огромное значение лишь для небольшого круга пользователей. Поэтому деление фаз на важные и неважные, в принципе, невозможно. Для ряда задач производители колонок предлагают специальные колонки, как, например, для разделения углеводов, пестицидов, триглицеридов и т.д.

Различные заместители в химической структуре стационарных фаз определяют вид взаимодействия (избирательности) между фазой и разделяемыми веществами и, таким образом, определяют их относительное удерживание. В качестве стационарных фаз применяют различные силоксаны, такие как диметил-, фенил- и цианопро-

пилсилоксаны, а также их смеси, что позволяет варьировать полярность стационарной фазы. Другой тип стационарных фаз представлен полиэтиленгликолями (ПЭГ).

Если нет специальных колонок, а в литературе отсутствует соответствующее приложение, то нужно попытаться разделить пробу на той колонке, которая стоит в газовом хроматографе. Ввиду высокой разделяющей способности современных капиллярных колонок есть хороший шанс для успешного разделения. Вследствие высокой инертности колонок из плавленного кварца и в отличие от заполненных колонок тип стационарной фазы в большинстве случаев не является решающим фактором. Основное правило, которое указывает на то, какая колонка могла бы быть использована для разделения, гласит: подобное растворяется в подобном, соответственно, Цицерон (умер в 43 г. до нашей эры) говорил: подобное с подобным соединяется охотно.

Неполярные компоненты нужно делить на неполярной колонке, а полярные – на полярной.

В табл. 3.1 дан небольшой обзор разделений на капиллярных колонках.

Таблица 3.1. Примеры разделений на различных капиллярных колонках

Разделяемые соединения	Тип колонки
алифатические углеводороды	100% диметилполисилоксан
ароматические углеводороды	7% цианопропил-, 7% фенил-, 86% метилполисилоксан
спирты	полиэтиленгликоль

В большинстве случаев для разделения достаточно капиллярной колонки длиной 25 м. Если разделение все же недостаточно хорошее, можно взять более длинную 50-метровую колонку. Еще более длинные колонки использовать не стоит, так как удвоение длины увеличивает разделение лишь на 40%, так как эффективность пропорциональна корню квадратному из длины колонки. С другой стороны, если на 25-метровой колонке пики очень хорошо разделены, то можно уменьшить время анализа, укоротив колонку до 10 м.

Колонки из плавленного кварца производятся пяти различных диаметров:

- мегаколонки с внутренним диаметром 0,53 мм являются альтернативой набивным колонкам. Их преимущество состоит в том, что при равной разделяющей способности время анализа на этих колонках значительно меньше;
- широкие колонки (внутренний диаметр 0,32 мм) и узкие колонки (внутренний диаметр 0,25 мм) подходят для решения большинства задач в капиллярной ГХ;
- микроколонки (внутренний диаметр 0,18 мм) имеют очень высокое разрешение и/или наибольшую скорость анализа. Эти колонки рекомендованы для ГХ/МС;
- микроколонки, применяются, как правило, в сверхкритической флюидной хроматографии, однако они могут использоваться в качестве высокоэффективных колонок и в ГХ, но к системе ввода пробы в этом случае предъявляются особые требования.

Таблица 3.2. Область применения различных сечений колонки

Тип капилляра	I_d , мкм	Число теоретических тарелок/м	Количество пробы, нг/компонент	Прибор	Поток газа-носителя, мл/мин
Микро	50–100	8000–12000	< 5	Быстрый ввод пробы с делением потока, очень быстрое детектирование и интегрирование	0,3
Мини Узкий Широкий	180 250 320	3000–7000	от 20 до 500	Инжекторы и детекторы для капиллярных колонок, быстрый самописец и интегратор	0,6–2,0
Мера	530	1500–2000	>1000	Приборы с адаптерами для наполненных колонок или простые капиллярные ГХ	3,0–10,00

Капиллярные микроколонки обладают очень высокой разделяющей эффективностью в единицу времени, но требуют аналитических приборов, которые соответствуют самому современному состоянию техники. Они не очень просты в управлении. Мини- и стандартные капиллярные колонки требуют газовых хроматографов, оснащенных для работы с капиллярными колонками (газовая хроматография высокого разрешения ВРГХ). Они используются в большинстве аналитических лабораторий. Капиллярные мегаколонки не требуют никаких специальных ГХ приборов и могут заменить большую часть еще до сих пор используемых наполненных колонок.

В табл. 3.2 показано влияние сечения колонки на эффективность разделения, емкость колонки и необходимое приборное оснащение.

Если точно неизвестно, какую колонку следует выбрать, то выбор может стать действительно мучительным делом. Обычно задают следующие вопросы:

- Нужно выбрать полярную или неполярную колонку?
- Какой I_d и какая толщина пленки лучше подходят для пробы?
- 30- или 60-метровую колонку нужно выбрать?

Некоторые аналитики не могут выбирать из разных типов колонок, так как в используемом ими протоколе анализа описана какая-то специальная колонка. Другие используют одну и ту же колонку для разных анализов, так как эта колонка, по крайней мере, надежно работает, хотя и не является лучшей для каждой пробы. Правильный выбор и оптимизация полярности колонки, диаметра колонки, толщины пленки стационарной фазы и длины колонки значительно повышают производительность колонки и надежность аналитических данных.

3.3.3.1. Полярность фаз

Полярность фаз оказывает большое влияние на разделение химических соединений. Только после того как полярность колонки была выбрана, могут быть оптимизированы диаметр колонки, толщина пленки стационарной фазы и длина колонки. Часто только с помощью правильного выбора полярности колонки удается провести разделения, которые не могут быть выполнены с менее подходящей колонкой независимо от того, какая у нее длина, толщина пленки или число теоретических

тарелок. Полярность колонки влияет также на температуру анализа. Например, если полярные компоненты анализируются на неполярной колонке, они будут удерживаться слабо, и температура колонки должна быть сильно понижена.

Полярность колонки зависит от того, каким образом компоненты пробы вступают во взаимодействие со стационарной фазой колонки. Стационарные фазы, с которых разделяемые компоненты элюируются в соответствии с их температурами кипения, считаются в общем случае неполярными. С ростом полярности механизм удерживания становится более сложным. Колонки со средней полярностью удерживают компоненты пробы как исходя из температур кипения, так и по степени взаимодействия индуцированных диполей или способности к образованию водородных связей. Механизм разделения на полярных и сильно полярных фазах основывается почти исключительно на взаимодействии функциональных групп пробы с функциональными группами фазы.

Неполярные фазы более стабильны и обладают более высокой термической устойчивостью. Неполярные фазы дают, как правило, более высокую эффективность разделения, чем полярные фазы. Неполярные фазы являются более устойчивыми к окислению, чем полярные. Они допускают хранение без особых предосторожностей и не так сильно, как полярные фазы, чувствительны к попаданию воздуха в ГХ-систему.

Полярные колонки удерживают полярные вещества дольше, чем неполярные. Механизм разделения основан на специфическом взаимодействии функциональных групп стационарной фазы и пробы, тогда как неполярные колонки делят компоненты пробы в первую очередь по их температурам кипения.

3.3.3.2. Внутренний диаметр колонки

Диапазон концентраций ключевых компонентов является важнейшим критерием для выбора оптимального внутреннего диаметра колонки. В качестве диапазона концентраций берут область между наименьшей и наивысшей концентрациями различных компонентов, которые нужно количественно определить в одной пробе в ходе анализа.

Например, в пробе углеводов ключевые компоненты представлены в концентрациях 0,1 мг/мл и 100 мг/мл, так что диапазон концентраций составляет 1 : 1000. Когда вводят 1 мкл с делением потока 1 : 100, то количества, которые в конечном счете достигнут колонки, лежат между 1 нг (для компонентов с наименьшими концентрациями) и 1000 нг (для компонентов с наивысшими концентрациями). В этом случае лучшим выбором является колонка с диаметром 0,53 мм, так как она позволяет работать с таким широким диапазоном концентраций, поскольку обладает нагрузочной емкостью > 1000 нг.

Существенным моментом является, таким образом, то, что наиболее высокая концентрация компонентов пробы не должна превышать максимальную емкость колонки, которая зависит от внутреннего диаметра колонки. Если емкость колонки превышена, то передний край пика не симметричен заднему, а форма не соответствует распределению Гаусса. Перегруженные пики (с искаженным фронтом) показывают наклоненный и растянутый передний край, тогда как задний

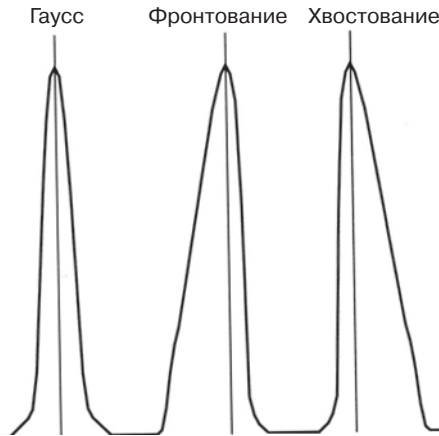


Рис. 3.6. Фронтование и хвостование пиков

край имеет правильную форму. Максимум этого перегруженного пика, кроме того, немного смещен относительно обычного положения.

Обратным эффектом является образование «хвостов». Это часто наблюдается, когда активные вещества адсорбируются на поверхности колонки. В общем случае, пики с «хвостами» ведут к большим временам удерживания. Большинство интеграторов могут количественно обработать площади пиков с небольшими эффектами перегрузки. На рис. 3.6 представлены различные формы пиков. Количественное определение в этом случае не должно, однако, основываться на высоте пика, так как это дает особенно неточный результат.

Таким образом диаметр колонки выбирают соответственно сложности пробы и ее концентрации:

- пробы с сильно различными концентрациями каждого компонента требуют колонок с большим сечением, так как необходима высокая нагрузочная емкость;
- пробы с близкими концентрациями каждого компонента можно анализировать на колонках любого диаметра, если концентрации невелики;
- для проб, содержащих следовые количества компонентов в диапазоне концентраций, близком к пределу обнаружения, нужно применять колонки с I_d 0,32 или 0,53 мм. Они позволяют больший массовый поток, который необходим для переноса большой пробы и кроме того для них меньше влияние мертвого объема;
- применение ГХ/МС может сделать необходимым выбор колонки с I_d 0,18 или 0,25 мм, чтобы не превышать производительность насоса;
- сложные пробы требуют большей эффективности для разделения компонентов, элюируемых близко друг к другу.

3.3.3.3. Оптимальная толщина пленки

Толщина пленки оказывает непосредственное влияние на удерживание и температуру элюирования каждого отдельного компонента пробы. Пленки большей

толщины дольше удерживают вещества и повышают температуру, необходимую для элюирования каждого компонента. Пленки меньшей толщины позволяют быстрее элюировать вещества и снижают температуру элюирования.

- Для низкокипящих веществ нужно использовать более толстые пленки, чтобы оптимизировать их взаимодействие со стационарной фазой и, вместе с тем, повысить удерживание и температуру элюирования.
- Очень толстые пленки (3,0 или 5,0 мкм) должны использоваться для веществ, которые анализируются при температурах близких к (или ниже) комнатной.
- Толстые пленки (1,0 или 1,5 мкм) используются для проб, элюируемых при 100–200 °С.
- Пленки стандартной толщины (0,25 или 0,5 мкм) подходят для проб, которые элюируются до 300 °С.
- Более тонкие пленки (0,1 мкм) идеально подходят для высокомолекулярных соединений, которые элюируются при температурах выше 300 °С.

3.3.3.4. Выбор длины колонки

Более длинные колонки обеспечивают большую эффективность разделения, увеличивая, однако, время анализа и его стоимость. Аналитик должен, таким образом, решить, перевешивает ли преимущество более длинной колонки и полученное при этом дополнительное разрешение снижение производительности колонки как следствие увеличения ее длины. Преимущества использования более длинной колонки различны для изотермических анализов или анализов с программированием температуры.

100 000 теоретических тарелок можно получить как на 10-метровой капиллярной колонке с I_d 0,1 мм, так и на 50-метровой колонке с I_d 0,53 мм.

При изотермическом анализе разделение растёт пропорционально квадратному корню из длины колонки, а длительность анализа — прямо пропорциональна длине колонки. Это значит, что удвоение длины колонки (например, от 30 до 60 м) повышает разделение примерно на 40%, но время анализа увеличится вдвое.

В анализах с программированием температуры улучшение разделения сопровождается лишь небольшим увеличением времени анализа, так как этот вид анализов позволяет веществам элюироваться, в первую очередь, согласно температуре колонки. Если проба анализируется на 30-метровой и 60-метровой колонке с точно совпадающими температурными профилями, то формально на 60-метровой колонке компоненты пробы выходят из колонки при более высоких температурах. Таким образом, сокращается время анализа.

Чаще всего используют колонки длиной 30 м. Примерно 50% всех колонок в лабораториях имеют такую длину. Этих колонок обычно достаточно для разделения большинства проб, и они обеспечивают наилучший компромисс, позволяющий сократить время анализа. Длины от 15 м применяют для быстрого скрининга, простых смесей или исключительно высокомолекулярных веществ. Колонки длиной 60 и 100 м нужно использовать, если требуется максимальная эффективность разделения для пробы исключительной сложности.

- Анализы с программированием температуры с длинными колонками обеспечивают значительное улучшение разрешения, не вызывая заметного повышения времени анализа.
- Для изотермических анализов более длинные колонки не всегда предпочтительны, так как время анализа удваивается с удвоением длины колонки.

3.3.3.5. Анализ газов

Смеси газов разнообразного состава находят сегодня широкое применение в промышленности, например, в качестве защитного, реакционного или горючего газа. Примерами являются использование газа для получения тепла или в таких термических процессах, как сварка, плавка или сушка продуктов. Для анализа газов существует множество методов. Газовая хроматография наряду со спектроскопическими методами принадлежит к числу наиболее широко используемых методов.

Название «газовая хроматография» говорит о том, что подвижная фаза – газ и перенос вещества в колонке происходит вблизи или слегка ниже температуры кипения вещества. Такие газы, как азот, кислород, окись углерода и углекислый газ, находятся, однако, уже при комнатной температуре далеко от их температур кипения. Поэтому для ГХ-разделения таких газов необходимы особые приемы. Анализ газов с помощью ГХ проводится в общем случае методами газоадсорбционной хроматографии. В то время как для жидких проб действует правило:

Использовать колонки с полярностью, равной полярности пробы, и проводить разделение при температуре кипения пробы,

оно не работает при анализе газов. Разделение газов происходит путем адсорбции на твердом носителе при температурах, которые лежат намного выше точек кипения.

Многие проблемы в анализе газов не могут быть решены традиционными методами – изменением температуры или выбором другой колонки. Хорошим примером тому является разделение кислорода, азота и диоксида углерода. Разделение O_2 и N_2 при температурах выше комнатной возможно только на молекулярно-ситовых колонках, где время удерживания CO_2 все же столь велико, что часто воспринимается как необратимая адсорбция. Существует много колонок, которые могут отделять CO_2 от воздуха, но все же ни одной, на которой одновременно все три компонента могут быть разделены для правильного количественного определения [3.8].

3.3.4. Переключение колонок

ГХ-анализ очень сложных смесей, которые содержат многочисленные, в том числе, изомерные компоненты различных классов веществ с различной летучестью, не приводит при однократном газохроматографическом разделении к получению достаточной информации о составе пробы и, тем более, к ее полному качественному и количественному анализу. Смеси природных веществ, например, нефти, содержат много сотен компонентов. Ни одна капиллярная колонка не может раз-

делить в одном анализе эти компоненты. Под каждым пиком всегда скрываются другие пики. В этом случае требуется многократное повторение хроматографического разделения с изменением хроматографических параметров. И это обстоятельство не может изменить ни использование капиллярных колонок специальной полярности с очень высокой эффективностью разделения, ни применение температурного программирования, соответствующего диапазону летучести пробы.

Больше и лучшего качества информацию о пробе можно получить путем одновременного проведения анализа пробы на двух колонках различной полярности и с использованием двух параллельных детекторов, например, селективного и неселективного. Время реального ГХ-анализа можно сократить, если отказаться от полного анализа и проводить только частичный анализ выбранных значимых компонентов (в смысле разделения и селективного детектирования). Хорошим примером частичного анализа является анализ равновесного пара методом газовой хроматографии «Headspace», при котором анализируются только летучие компоненты, которые с достаточным давлением пара представлены в поровом пространстве сосуда с пробой. При такой селективной подаче пробы более тяжелые или нелетучие компоненты вообще не попадают в хроматографическую систему. Это сокращает время анализа и предотвращает загрязнение системы.

При многомерной газовой хроматографии колонки включаются в серию. Каждая группа веществ может тогда разделяться на специально выбранной фазе. Эффективность разделения при этом умножается. В предколонке такой системы можно проводить предварительное или групповое разделение, выход также может контролироваться монитором-детектором. Только часть элюата предколонки с помощью таймера и переключателя колонок вырезается и переносится в рабочую колонку, где начинается новое разделение при другой температуре, другой эффективности разделения и другой полярности. Неинтересные и мешающие плохо- или легколетучие примеси (а также растворитель) одновременно или после предварительного разделения удаляются из системы перед пробой или, наоборот, за пробой (обратная продувка) и не достигают рабочей колонки и детектора [3.10].

На рис. 3.7 представлен пример системы с переключением колонок с обратной промывкой пробы в аналитическую колонку. Эта техника представляет альтернативу многократному анализу и позволяет одновременно определять сильно различающиеся классы веществ. Эта система подходит также для оптимального разделения смесей сильнополярных и неполярных компонентов. Для каждой группы можно выбрать соответствующую аналитическую колонку. При этом важным является то, что первая колонка делит обе группы веществ друг от друга. С помощью правильного выбора длины колонки и диаметра сечения, так же как скорости потока, при одновременном анализе на обеих колонках можно избежать одновременно элюируемых пиков, а также падения давлений и градиентов потока.

Комбинированные системы колонок могут использоваться также для подготовки проб. Так как емкость каждой колонки ограничена, на колонку может быть нанесено только определенное количество вещества. Для анализа следовых количеств дополнительно должно проводиться обогащение пробы, которое может быть осуществлено с помощью системы колонок. Достаточное количество пробы

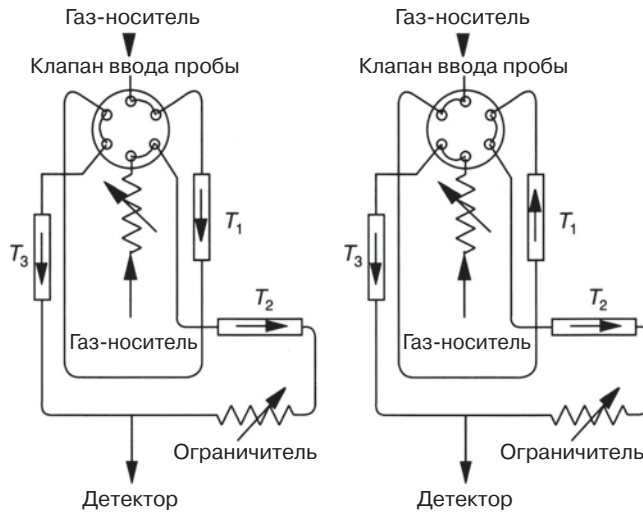


Рис. 3.7. Система для анализа сложных смесей, обратная промывка аналитической колонки

вносится в первую капиллярную колонку, которая допускает значительную перегрузку. Фракции, содержащие определяемые компоненты, вырезают и делят на второй капиллярной колонке [3.11].

3.4. Термостаты

В процессе ГХ разделения участвуют только те компоненты смеси, давление пара которых над используемой стационарной фазой достаточно велико, чтобы перенос вещества в мобильной фазе вообще мог происходить с приемлемой скоростью, то есть разделение и анализ, соответственно, проходили за разумное время. Температура колонки влияет на абсолютную и относительную хроматографическую летучесть разделяемых компонентов и, тем самым, на разрешение и время разделения. Летучесть высокомолекулярных или сильнополярных соединений, конечно, можно увеличить повышением температуры колонки. Температура колонки наряду с выбором подходящей стационарной фазы и оптимальной скорости потока газа-носителя является важнейшим параметром, который должен быть оптимизирован для практического разделения, то есть должен быть подобран для пробы определенного состава. Полное время анализа и хроматографическое разрешение сильно зависят, таким образом, от температуры колонки.

Выбор рабочей температуры определяется следующими факторами:

- диапазон летучести компонентов анализируемой смеси. Летучесть определяется давлением пара компонентов и их растворимостью в стационарной фазе;
- длина колонки и еще приемлемая максимальная длительность анализа;
- количество стационарной фазы в колонке, как абсолютное, так и относительное по сравнению со свободным объемом колонки.

Если разделение компонентов смеси не представляет трудностей, то скорость разделения можно повысить, подняв температуру колонки. Такой подход экономит время анализа. Температуру все же не следует поднимать слишком высоко, так как при этом селективность разделения важных пар веществ будет слишком низкой и, кроме того, лабильные компоненты смеси подвергаются термическому распаду. В общем случае разделение проводят при температурах, которые лежат несколько ниже точки кипения наиболее трудно разделяемых компонентов. Поскольку в капиллярных колонках находится очень малое количество стационарной фазы, то капиллярная хроматография может проводиться при более низких температурах, чем в случае заполненных колонок. Это означает, что температура колонки может быть почти на 100 °С ниже точки кипения наиболее высоко кипящего компонента. Используя короткие капиллярные колонки с тонкими пленками термически устойчивых стационарных фаз, можно добиться элюирования очень трудно летучих соединений при температурах ниже 300 °С.

В принципе, колонки могут работать либо в изотермическом режиме, либо в режиме программирования температуры. При повышении температуры повышается давление пара хроматографируемых компонентов. Соответственно их перенос по колонке происходит быстрее. Пробы, исследуемые на практике, как правило, являются смесями компонентов с различными температурами кипения. В изотермическом режиме колонка находится при постоянной температуре, при которой либо более летучие компоненты не разделяются, либо труднолетучие компоненты удерживаются очень сильно или не элюируются совсем. Найти оптимальную температуру для разделения большого числа пар веществ с различными диапазонами летучести, как правило, невозможно. Такое разделение все же можно провести в режиме программирования температуры.

Ввиду того, что время удерживания гомологов возрастает логарифмически с ростом числа атомов углерода, продолжительность анализа сильно возрастает, если проба наряду с низкокипящими компонентами, которые для своего разделения требуют низкой температуры, содержат также вещества с большой молекулярной массой и, соответственно, более высокими температурами кипения. В этих случаях используют программирование температуры, то есть повышают температуру колонки в процессе разделения. Таким образом, низкокипящие и вместе с тем быстроэлюируемые компоненты будут в достаточной степени разделены при низких температурах колонки, тогда как элюирование высококипящих компонентов будет ускорено повышением температуры при дальнейшем анализе. Ширина пиков поздноэлюируемых компонентов сужается до «нормальной» величины, и вещества могут быть идентифицированы с большей точностью и надежностью.

Следует отметить, что более 80% всех разделений в ГХ проводятся в режиме программирования температуры и лишь небольшая часть – в изотермическом режиме. Конечно, при этом после каждого анализа и достижения максимальной температуры термостат нужно снова охладить для возвращения к начальным условиям. Для ускорения процесса охлаждения дверца термостата автоматически открывается и при достижении исходной температуры снова закрывается.

Термостат в ГХ должен удовлетворять трем важным требованиям, а именно: точности и воспроизводимости установления температуры и создавать возможно

более однородное распределение температуры внутри термостата. Электронное регулирование позволяет устанавливать температуру с точностью лучшей $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ в диапазоне от 50 до $450\text{ }^{\circ}\text{C}$. При работе в режиме программирования температуры ее можно повышать со скоростью от $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $50\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Для того чтобы в термостате можно было установить сразу несколько колонок и иметь возможность их переключения, существуют термостаты с объемом до 20 л .

Поскольку характеристики удерживания зависят от температуры, то их воспроизводимое измерение возможно только в том случае, если сама температура может быть точно установлена, отрегулирована и измерена. Воспроизводимые величины удерживания важны не только для качественного, но и для рутинного количественного анализа и для хроматографического анализа производственных процессов. Колебания температуры термостата сказываются на правильности измеряемых величин удерживания. Колоночные термостаты должны отвечать следующими требованиями:

- постоянство температуры,
- низкий температурный градиент в термостате,
- точное и правильное измерение температуры термостата,
- хорошая доступность пространства термостата для соединения с другими приборами,
- быстрое и, по возможности, автоматическое охлаждение,
- регулируемая скорость нагрева.

Для того чтобы разделить сложные смеси, необходимы различные скорости нагрева, откуда вытекает необходимость, по меньшей мере, двухступенчатого температурного программирования. В коммерческих приборах применяются исключительно воздушные термостаты. Рис. 3.8 показывает распределение потока воздуха в термостате. Управляемый микропроцессором регулятор температуры позволяет устанавливать температуру колонки с высокой точностью. Только такие приборы гарантируют хорошую воспроизводимости времени удерживания в случае программ с быстрым программированием температуры.

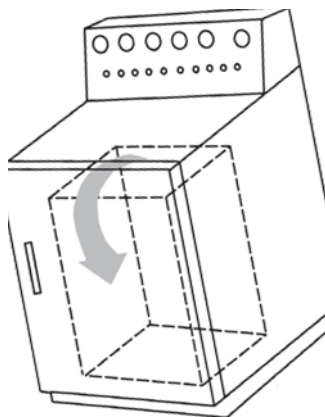


Рис. 3.8. Колоночный термостат

3.5. Систематическое развитие метода ГХ

Если газохроматографическое разделение удастся провести за более короткое время, то достигаются две важные цели:

- выигрыш по времени и финансовым затратам,
- выигрыш в пределе обнаружения, так как пики будут более высокие и узкие и, тем самым, улучшается соотношение сигнал—шум.

Особенно в том случае, когда разрабатываются методы, которые позднее должны использоваться в рутинном анализе, есть смысл заняться их оптимизированием, так как хорошего разрешения можно достичь только для узких пиков и при большой разнице их времени удерживания. Несмотря на иногда значительную трудоемкость процесса оптимизации, в дальнейшем это позволит сэкономить деньги и время. Каждый аналитик должен быть заинтересован в том, чтобы при минимуме затрат достичь оптимальной точности и воспроизводимости используемого аналитического метода.

При этом временные затраты и затраты на приборы должны быть соразмерны задаче и, с другой стороны, по-возможности гибко соответствовать поставленным требованиям. Однажды разработанные протоколы анализа должны быть легко доступны в рутинной работе, а новые протоколы должны быть наглядными и понятными. Если рассматривают эти требования как обязательные для аналитического прибора, то выдвинутые здесь условия в полной мере могут быть реализованы только в системе, управляемой компьютером.

При оптимизации метода капиллярной газовой хроматографии должны учитываться следующие параметры:

- селективность стационарной фазы,
- температурная программа,
- тип газа-носителя,
- скорость газа-носителя и
- геометрия разделительной колонки (длина и внутренний диаметр).

Множество оптимизируемых параметров сначала приводит в замешательство, однако большинство из них все же очень легко контролировать и оптимизировать. Так, влияние приведенных выше параметров длины и внутреннего диаметра колонки, скорости и типа газа-носителя можно оценить на основе очень простых рассуждений, представленных ранее. С помощью компьютерных программ стало также возможным моделирование условий разделения. Это позволяет значительно сократить время оптимизации по сравнению с традиционным методом «проб и ошибок» [3.12].

Наиболее трудно оптимизировать селективность и температурную программу, которые должны оптимизироваться на основании экспериментов. Особое значение для оптимального использования селективности фазы имеет температурная программа. Сейчас существуют новые специальные компьютерные программы, которые позволяют разработать оптимальную температурную программу за короткое время. Для этого проводят два анализа с различными скоростями нагрева в широком диапазоне температур, идентифицируют пики в каждом из разделе-

ний и запоминают в программе время удерживания компонентов при обеих скоростях нагрева (рис. 3.9). Программа позволяет затем рассчитать время удерживания и разрешения для любой температурной программы и распечатать соответствующие хроматограммы [3.13].

Предсказание основывается на приблизительной линейной зависимости величины $\log k'$ от температуры. Как правило, рассчитанное время удерживания

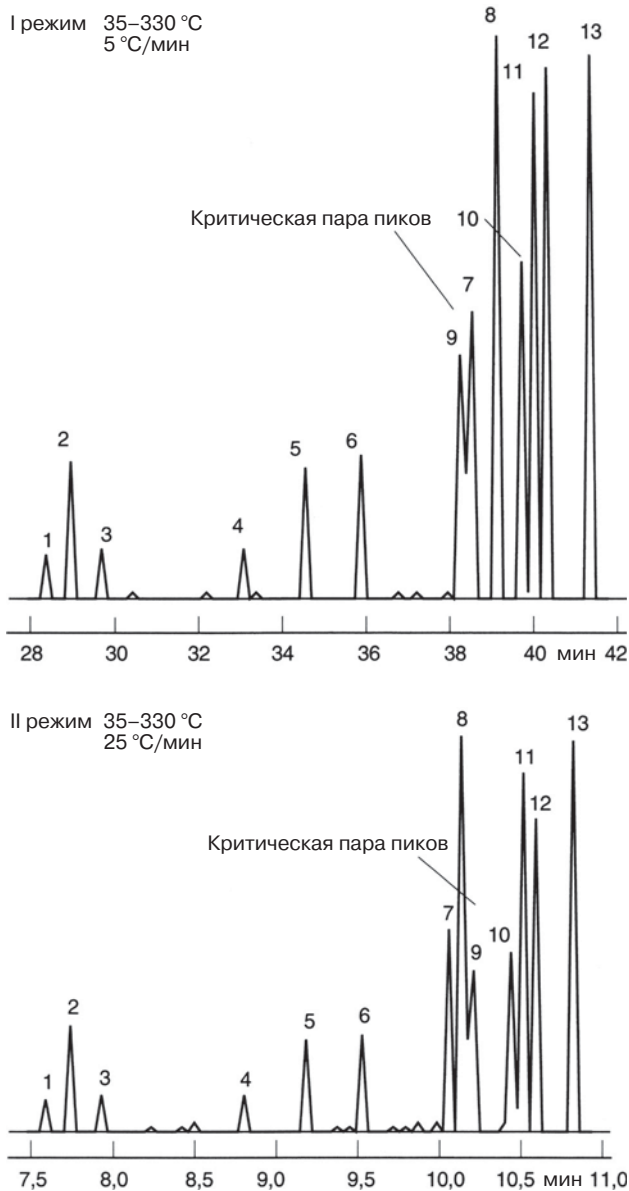


Рис. 3.9. Газовые хроматограммы, полученные в двух разных режимах программирования температуры

оказывается правильным в пределах нескольких процентов, а найденные разрезания – в пределах $\pm 10\text{--}15\%$. Когда оптимальное разделение найдено, предсказание можно подтвердить третьим экспериментом.

3.6. Ввод пробы

Ввод пробы не следует путать с подготовкой пробы. Здесь в основном речь должна идти о том, как обращаться с пробой, уже готовой для анализа. Правильные результаты анализа заранее предполагают безупречное хранение и обработку пробы. Таким образом, должны учитываться такие специфические свойства пробы, как чувствительность к свету или температуре, лабильность или ее гетерогенность. Кроме того есть ряд проб, которые не могут обрабатываться «нормальным» образом. Сюда относятся, например, пробы, которые регистрируют в оперативном (online) режиме, или пробы, анализируемые прямыми аналитическими методами, при изучении кинетики реакций.

Введение пробы в хроматографическую систему должно происходить так, чтобы обеспечить максимальную эффективность колонки и чтобы представительная проба попадала в колонку без изменения ее исходного состава. Этого можно добиться только с помощью выбора соответствующих данному типу пробы методов ввода пробы и тщательной оптимизации параметров ввода пробы. Различные агрегатные состояния вещества, как и различные физико-химические свойства проб, требуют, соответственно, различных подходов.

3.6.1. Газообразные пробы

Для правильного отбора проб и работы с газами необходимо учитывать их специфические физико-химические свойства. Так как газы в большинстве случаев невидимы и неуловимы, источником ошибок часто является отбор проб, их обработка и дозирование. Когда начинают заниматься анализом газов, то часто возникают значительные трудности.

Газообразные пробы можно собирать в так называемых «газовых ловушках». Они заполняются интенсивным потоком при избыточном давлении или под вакуумом, или забором газообразной пробы в предварительно вакуумированную «газовую ловушку». Последняя техника рекомендуется при количественных анализах, так как нужна надежная защита от проникновения воздуха.

Наибольшие трудности возникают при следовом анализе агрессивных и/или вызывающих коррозию газов (например, диоксид серы, оксид азота) или гигроскопичных соединений. Здесь следует особо указать три источника ошибок. Компонент не определяется, если имеет место:

- **гидролиз** – он может сделать невозможным определение, например, фосгена во влажных газах. В присутствии водяного пара отбор пробы следует проводить с помощью осушающей трубки с осушающими материалами (молекулярными ситами, оксид фосфора (V)), охлаждающей ловушки или защитного газа;

- **конденсация** — конденсация составных частей пробы часто наблюдается при повышенных температурах отбора проб. Здесь следует обратить внимание на то, что определяемые газообразные компоненты растворяются в жидкой фазе и, таким образом, «ускользают» из анализа;
- **адсорбция на стенках сосуда** — полярные соединения склонны легко адсорбироваться на поверхности из стекла или металла. Этот эффект можно уменьшить, применив газосборник, покрытый тефлоном.

Этими эффектами можно пренебречь, если определяемые компоненты присутствуют с высоким содержанием. Большинство ошибок появляется при определении следовых количеств. Часто их можно избежать, проводя возможно более быстрый анализ. Ввод газообразных проб проводят либо с помощью газонепроницаемого шприца, либо с помощью дозирующей петли.

3.6.1.1. Газонепроницаемые шприцы

Все газовые хроматографы оснащены устройством ввода жидких проб шприцами через резиновые прокладки в нагреваемый инжектор. Этот вид ввода пробы можно, конечно, использовать также и для газов, используя газонепроницаемые шприцы. Тем не менее, рекомендовать этот прием нельзя. Он является источником большого количества ошибок и не подходит для количественного анализа, так как нужно преодолевать давление газа-носителя и проба при сжатии может частично конденсироваться. Подача пробы при этом является неполной и невоспроизводимой.

3.6.1.2. Газодозирующие петли и многоходовые краны

Есть различные модели кранов-инжекторов для ввода газообразных проб, снабженные дозирующими петлями разных объемов. Наиболее часто и в зависимости от применения краны устанавливают или в ГХ, или в термостат. Этот метод обеспечивает аналитику не только самую высокую воспроизводимость дозирования пробы, но и во многих случаях единственно возможный способ ввода пробы.

Во всех методах, тем не менее, действует одинаковый принцип: определенный объем газовой пробы при постоянной температуре вводится в систему и переносится потоком газа-носителя на аналитическую делительную колонку. Величина объема варьируется от 0,1 до 10 мл. Тем не менее, в нескольких случаях предлагаются также меньшие объемы до 0,5 мкл.

Многоходовые краны для ввода газовых проб применяются во многих лабораториях. Они производятся из разнообразных материалов и могут снабжаться электрическим или пневматическим приводом. Их применяют в основном при комнатной температуре, и они стабильны при давлениях до 10 бар. Реже устанавливают обогреваемые краны с индивидуальным нагревом или в ГХ-термостате. Максимальная рабочая температура устанавливается в первую очередь с учетом материалов уплотнений. Кроме того, в особых случаях есть специальные модели для более высоких давлений или агрессивных газов.

3.6.2. Жидкие пробы

Жидкие пробы могут быть как индивидуальными жидкими веществами, так и смесями жидких соединений или растворами твердых веществ. Процедура в целом относительно проста. Следует обратить внимание на специфические свойства проб, как, например, склонность к разложению, светочувствительность или нестатистическое распределение составных частей пробы. Принципиально пробы должны храниться в плотно закрытых емкостях из стекла или пластмассы с инертными пробками. При этом идеальным являются уплотнения, покрытые тефлоном. Пространство, не занятое жидкой пробой, должно быть небольшим, чтобы избежать окисления и накопления легкокипящих компонентов в парах. При более длительном промежутке времени между получением пробы и анализом рекомендуется хранение при низких температурах. С особой осторожностью следует работать с пробами, содержащими легколетучие компоненты.

Жидкие пробы вводятся в систему, в основном, микролитровыми шприцами. Острые иглы имеют скошенный конец (угол наклона от 17 до 22°), чтобы добиться хорошего прохождения иглы через прокладку. Иглы с плоско сточенным концом не подходят для введения пробы через прокладку, так как этот тип игл оставляет в ней дырки. Объем шприцев, которые используют сегодня, лежит между 0,5 и 10 мкл. При этом различают два типа шприцов:

- шприцы, дозирующие из иглы;
- шприцы, дозирующие из стеклянного поршня.

Шприцы с дозирующей иглой делают возможным подачу малых объемов пробы. Соответствующие шприцы имеют объем 0,5 и 1,0 мкл и делают возможным воспроизводимую подачу пробы объемом 0,05 или 0,25 мкл, соответственно. У этого типа шприцев мениск жидкости не виден. Отбираемый объем показывает специальная гильза, связанная с поршнем. Настоящий дозирующий поршень, который при подаче пробы доходит до конца иглы, находится внутри гильзы. Вследствие конструктивных особенностей иглы некоторых шприцов оказываются толще, чем обычно, что приводит к быстрому разрушению прокладок. Следует обращать внимание на то, чтобы при работе поршень не извлекался полностью из шприца, так как иначе его очень легко повредить. У этих шприцов нет мертвого объема. Они хорошо подходят для введения проб с высокой вязкостью, так как имеют постоянное сечение, которое не меняется от иглы к стеклянному цилиндру.

Стеклянные шприцы, которые подают пробу из стеклянного цилиндра, обладают, как правило, более тонкими иглами. Типичные объемы этих шприцев – 5 или 10 мкл – позволяют воспроизводимую подачу 0,1 или 0,2 мкл. Производители предлагают шприцы с несъемными и сменными иглами. Поршни сделаны из тонкой стали и могут легко деформироваться при прокалывании прокладки. Если иглу или стеклянный цилиндр берут в руки, то вследствие нагрева это может привести к испарению легкокипящих компонентов. Для предотвращения этой ошибки шприц следует брать рукой только в верхней его части. В зависимости от поперечного сечения иглы мертвый объем этих шприцов составляет 0,5 или 1,0 мкл для шприцов объемом 5 или 10 мкл, соответственно [3.14].

Для заполненных колонок оптимальные количества вводимых проб лежат между 0,1 и 1 мкл для каждого компонента и, соответственно, выше для всей смеси в зависимости от количества компонентов. Для капиллярных колонок, с учетом размера пробы еще приемлемого для достижения эффективного разделения, эта величина от 200 до 1000 раз меньше. Дозировку и ввод проб в заполненные колонки проводят микрошприцами объемом от 1 до 10 мкл, которые позволяют воспроизводимо вводить до 0,1 мкл пробы. Тем не менее, пробу лучше разбавить не мешающим хроматографическому анализу растворителем, чем вводить в минимальном объеме. Низкокипящий растворитель покидает колонку первым, а наблюдаемый на хроматограмме исключительно большой пик, конечно, не обрабатывается. Самоуплотняющаяся прокладка, через которую микрошприцем вводят пробу, сделана из силиконовой резины и время от времени должна заменяться.

Принципиально должна быть разница между подачей пробы с испарением и без. Универсального метода подачи пробы все же не существует, и, таким образом, нужно подстраивать технику соответственно каждой аналитической задаче.

Общие требования к подаче пробы:

- для **количественного** анализа — слишком быстрая или медленная подача проб может привести к значительным ошибкам вследствие дискриминации или химических реакций в инжекторе;
- для **качественного** анализа — выбор неправильной системы подачи проб может привести, в крайнем случае, к полному исчезновению отдельных компонентов.

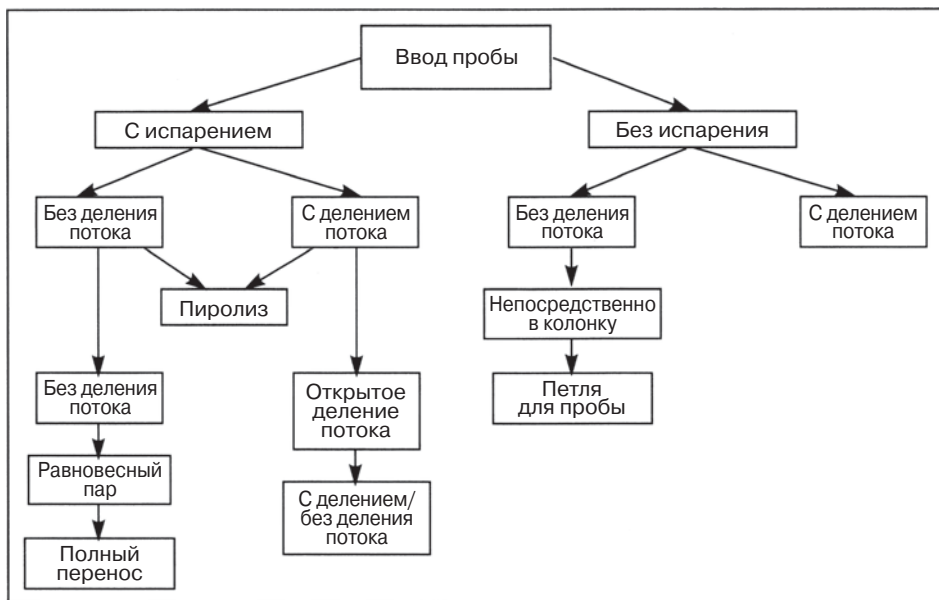


Рис. 3.10. Возможные варианты ввода проб в ГХ

При многообразии предлагаемых производителями систем ввода проб некоторые утвердились на практике в качестве стандартных приемов. Рис. 3.10 показывает различные способы подачи пробы.

3.6.2.1. Ввод пробы с помощью испарения

Основным условием газохроматографического анализа жидких или твердых проб является возможность перевода их в паровую фазу.

Этого добиваются полным или фракционированным испарением пробы в инжекторе или подачей проб непосредственно на колонку (on column). Самым простым методом является испарение пробы в нагреваемом инжекторе.

В общем случае, температура компонентов вводимой пробы должна быть ниже температуры колонки. При вводе жидких проб инжектор нагревается электрически и термостатируется при заданной температуре. Температура инжектора регулируется независимо от температуры колонки. Быстрым испарением жидкой пробы в инжекторе достигают более полного соответствия состава пара составу пробы и предотвращают конденсацию или адсорбцию труднолетучих или полярных компонентов.

3.6.3. Подача пробы на капиллярные колонки

В аналитической газовой хроматографии высокие требования к разрешению, границе обнаружения следовых количеств и щадящему обращению с неустойчивыми компонентами проб могут быть выполнены только с помощью капиллярных колонок. Они представляют собой тип колонок, которые имеют уменьшенные геометрические размеры (внутренний диаметр от 0,2 до 0,5 мм), но одновременно и более низкую предельную нагрузку по разделяемой пробе. Ввод пробы объемом 1 мкл уже полностью перегружает капиллярную колонку, однако дозирующие устройства (шприцы) допускают объемы только от 0,2 до 1 мкл. Нагрузка капиллярных колонок может быть в пределах только нанограммов по каждому компоненту. Оптимальные количества пробы могут подаваться на капиллярные колонки только с помощью специальных методов, причем должны быть выполнены следующие условия:

- при вводе пробы следует предотвращать какие-либо изменения количественного состава исходной пробы и термическое и/или каталитическое разложение неустойчивых компонентов пробы;
- особые проблемы, относящиеся к подаче пробы, возникают в капиллярной ГХ из-за того, что элюируемые пробы очень сильно разбавлены и, кроме того, содержат компоненты в широком диапазоне летучести и/или полярности, а также, из-за того, что с очень малыми количествами пробы нельзя работать традиционными методами;
- манипуляции и перенос очень маленьких количеств проб в ГХ-систему может происходить только в разбавленной матрице подходящего растворителя (используются микролитровые шприцы с общим объемом от 5 до 10 мкл). При этом вспомогательная матрица растворителя в определенных условиях может оказывать сильное влияние на разделение и детектирование пробы.

Для газовой хроматографии с капиллярными колонками есть много различных методов ввода проб [3.15]. С начала 80-х годов часто используемые приемы ввода пробы – это непосредственный ввод пробы на колонку (on-column) и метод замораживания пробы, при которых жидкая проба вводится непосредственно на головную часть колонки.

3.6.3.1. Классические методы ввода пробы

Для выбора подходящей техники подачи пробы нужно различать концентрированные пробы и пробы, сильно разбавленные, с широким диапазоном летучестей, полярностей и концентраций значимых компонентов. Для менее разбавленных проб лучше всего подходит система ввода пробы с делением потока, так как она позволяет изменять деление потока и получать правильную нагрузку колонки для значимых (основных) компонентов.

ВВОД ПРОБЫ С ДЕЛЕНИЕМ ПОТОКА

Этот метод был разработан специально для капиллярных колонок, так как они обладают очень ограниченной нагрузочной емкостью. В соответствии с принципом деления потока газа только часть испаренной пробы подается на колонку. Пробу вводят шприцем в связанное с колонкой нагреваемое устройство (испаритель), испаряют и подают в колонку с делением потока в соотношении примерно от 5 : 1 до 500 : 1. Это означает, что поток газа-носителя (I_g) в методе разделения потока так распределяется в выбранном соотношении, что меньшая часть пробы попадает в колонку (I_s), а остаток отводится в другом направлении (I_d). На рис. 3.11 показано, что в направлении потока находится переменный дроссель, сопротивление (R_d) которого устанавливается в соответствии с сопротивлением параллельно присоединенной колонки, и таким образом получают правильное соотношение между потоком, идущим через колонку, и потоком, идущим через дроссель.

Впрыскивание пробы происходит в сменную испарительную цилиндрическую трубку (так называемый лайнер). Для тщательного перемешивания испарен-

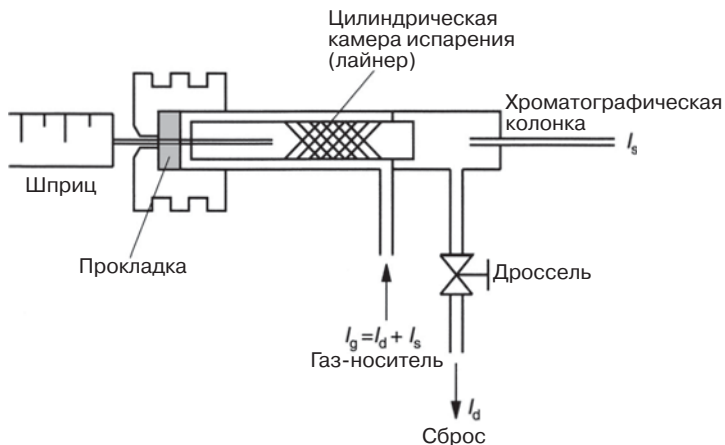


Рис. 3.11. Разделение потока при вводе пробы (ввод пробы с делением потока)

ной пробы и газа-носителя предлагаются лайнеры различной конфигурации. Чаще всего используются конструкции, представляющие собой прямую стеклянную трубку, которые могут иметь различные диаметры.

Диаметр лайнера определяет объем вводимой пробы, и его следует выбирать соответственно объему испарения. Для лучшей гомогенизации лайнеры могут полностью или частично заполняться стекловолокном или стеклянными шариками. Часть испаренной пробы, направляемая на сброс, улавливается в заполненной активированным углем поглощающей трубке и, таким образом, не попадает в атмосферу лаборатории.

Значительные проблемы вследствие эффектов дискриминации возникают при введении проб с широким диапазоном температур кипения. Под дискриминацией подразумевается неодинаковое деление в потоке легко- и труднокипящих компонентов. Другой причиной дискриминации является повышение вязкости газа за счет испаренной пробы, когда газовая смесь проходит мимо системы деления потока (сплиттера). Дискриминации в делителе потока несмотря на все принимаемые меры полностью избежать не удастся. Поэтому имеет смысл добиться правильного количественного определения, используя соответствующие внутренние стандарты.

Преимуществом ввода пробы с делением потока является легкое варьирование величины нагрузки колонки в зависимости от разбавления пробы как изменением объема используемого шприца, так и изменением соотношения деления потока и скорости переноса испаренной пробы по колонке.

Недостатки подачи пробы с делением потока — это высокая температура в испарителе, которая препятствует воспроизводимому введению определенного объема пробы и которая вместе с проблемами, возникающими при делении потока, приводит к изменению относительного состава пробы. Это особенно касается проб с большим диапазоном летучестей и высоким содержанием растворителей.

ВВОД ПРОБ БЕЗ ДЕЛЕНИЯ ПОТОКА

При такой технике дозирования проба после испарения полностью переносится на колонку. Чтобы не перегрузить колонку, проба разбавляется подходящим растворителем. Растворитель должен при этом быть самым низкокипящим компонентом. Он обладает наименьшим временем удерживания и покидает колонку первым. Используемая капиллярная колонка сильно перегружена растворителем, что ведет к большим пикам с заметными «хвостами», тем не менее, это совсем не сказывается или незначительно влияет на элюирование и разделение следовых компонентов.

Подачу пробы без делителя целесообразно применять тогда, когда по составу пробы можно ожидать эффекты дискриминации при вводе пробы. Любой инжектор с делением потока в принципе можно применять в этом методе, если перекрыть выход делителя.

Преимущества подачи пробы без делителя: вся проба достигает колонки, нагрузка колонки из-за деления потока не будет слишком маленькой.

Недостатки подачи пробы без делителя: метод применим только для многокомпонентных проб или для таких, которые вследствие разбавления находятся во

вспомогательной матрице. Трудности возникают, поскольку колонка перегружена растворителем и испаренная проба медленно переносится из испарителя в колонку. Вероятность термического разложения неустойчивых веществ возрастает.

Методы ввода пробы, как с делением потока, так и без, являются «горячими» методами, которые требуют испарения пробы вне колонки в так называемом испарителе, что, в зависимости от летучести компонентов проб, требует применения высоких температур, то есть температур часто более высоких, чем те, при которых работает колонка. Термически неустойчивые вещества при этом могут разлагаться уже в инжекторе.

3.6.3.2. Ввод пробы непосредственно в колонку (*On-column*)

С помощью метода «*On-column*», который для наполненных колонок известен уже давно, количественные анализы могут проводиться с более высокой точностью и достоверностью и для смесей компонентов, температуры кипения которых лежат в широком диапазоне. Жидкая проба без деления потока с помощью специального устройства вводится непосредственно в колонку (рис. 3.12). Наружный диаметр иглы шприца так мал, что его можно ввести непосредственно в капилляр. При таком методе жидкая проба помещается прямо в начало колонки, причем при низкой температуре. Испарение происходит в капиллярной колонке — без перегрева или испарения пробы во внешнем устройстве [3.16].

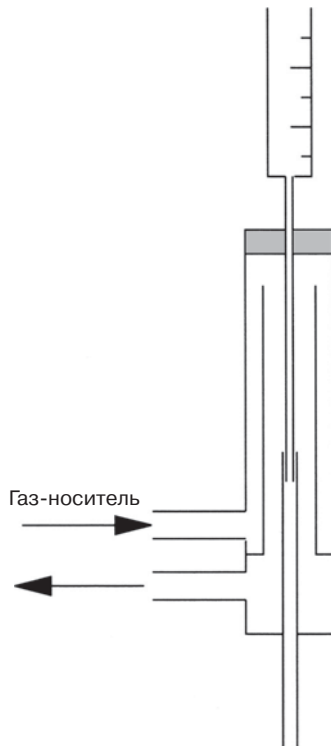


Рис. 3.12. Схематическое изображение ввода пробы на колонку

Таким образом, речь идет о методе холодного ввода пробы. Нет никакой разницы между температурой ввода пробы и начальной температурой колонки, которая затем повышется по заданной программе. Ввод пробы на колонку рассматривается многими ведущими хроматографистами как идеальное решение для количественной капиллярной ГХ. Так как такая подача не требует особых навыков, ее легче применять, чем другие методы. Не только опытный аналитик знает, что прямой ввод облегчает количественный анализ, но и начинающий исследователь в этой области извлечет пользу из этого метода.

В зависимости от приборных возможностей различают два метода холодного ввода пробы:

- если инжектор не снабжен ни охлаждением, ни нагревом, то испарение и последующее разделение пробы происходят в рамках температурной программы хроматографической колонки;
- в том случае, если инжектор охлаждается или нагревается, происходит ввод пробы посредством контролируемого изменения температуры инжектора при постоянной температуре колонки.

Очевидное преимущество этой техники для многих проб заключается в отсутствии эффектов дискриминации, так как испарение пробы происходит внутри колонки. Отсюда же, тем не менее, возникают и недостатки: объем колонки, как правило, очень мал и имеет неподходящую геометрию, так как в процессе испарения происходит значительное увеличение объема. Поэтому, прежде всего, нужно согласовать температуру колонки при введении пробы с температурой кипения растворителя, чтобы избежать слишком бурного испарения. Благоприятным в любом случае является ввод проб с программированием температуры, и даже быстрое (баллистическое) повышение температуры может иметь преимущества в определенных областях (например, анализе высококипящих компонентов).

Преимущества прямого ввода пробы на колонку: замечательная техника ввода для количественной капиллярной ГХ. Никакого перегрева пробы, никаких ошибок при делении потока, высокая точность и воспроизводимость, подходит для проб с широкой областью точек кипения и полярностей, очень прост в реализации.

Недостатки: испарение в колонке ведет к более сильному увеличению объема, сопровождающемуся повышением давления и, как результат этого, возможной потерей пробы из-за обращения потока, что может приводить к двойным пикам или их уширению.

Данный метод, основное преимущество которого — полностью прямой ввод пробы в колонку, что означает всего один акт переноса пробы, имеет и ограничение: в колонку можно вводить только малые количества вещества. Этого достигают разбавлением пробы растворителем, но при этом растворитель проходит через всю колонку. В зависимости от вида колонки при больших объемах пробы это может быстро привести к перегрузке колонки.

Для анализа ультранизких (следовых) количеств увеличение объема пробы часто является простейшим способом повысить чувствительность. Для этого необходимо вводить большие объемы проб порядка 100 мкл, чтобы концентрации в диапазоне до триллионных долей можно было обнаружить без предварительного

обогащения. Этого добиваются с помощью предварительного отделения анализов от растворителя на предколонке и сброса (упаривания) избытка растворителя через клапан в автоматическом режиме.

Через автоматическую систему подачи пробы (автодозатор) проба вводится на предколонку с большей скоростью, чем скорость испарения, причем равномерная пленка растворителя наслаивается на предколонку. Испаренный растворитель удаляется через открытый на время ввода выходной клапан. Также низкокипящие части пробы остаются при этом в пленке растворителя на предколонке. В результате этого одновременного ввода и сброса предколонка используется для концентрирования. После успешного ввода больших объемов проб и закрытия выпускных клапанов начинается собственно хроматографическое разделение [3.17].

3.6.3.3. Холодная система ввода пробы

Еще один метод, помимо описанных выше, называемый методом холодного ввода пробы, был введен в 1981 году. При испарении с программированием температуры (ИПТ) жидкую пробу вводят в испаритель, температура которого ниже точки кипения растворителя (рис. 3.13). Растворитель испаряется и через устройство для деления потока выходит наружу. Проба должна оставаться в жидком состоянии до полного окончания ввода, чтобы гарантировать полный перенос пробы из шприца в лайнер [3.18]. Кроме того, компоненты пробы задерживаются на стеклянном или кварцевом наполнителе трубки испарителя.

После этого испаритель может под управлением компьютера нагреваться в строго заданных условиях. При этом проба испаряется внутри камеры, и компоненты попадают на хроматографическую колонку. Скорость нагрева выбирают таким образом, чтобы предотвратить или, по меньшей мере, ограничить, с одной стороны, уширения пиков вследствие слишком долгого пребывания пробы в ка-

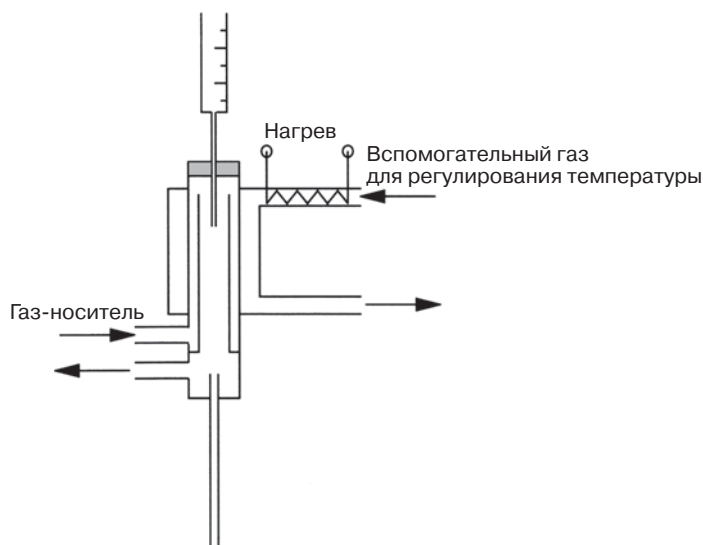


Рис. 3.13. Система холодного ввода пробы

мере, а, с другой стороны, чтобы избежать или по меньшей мере ограничить взрывоподобную волну сжатия. С этой точки зрения скорость нагрева меняется от комнатной температуры до 400 °С в течение 40 секунд. С другой стороны, за счет возможности программирования различных температурных режимов есть возможность сбрасывать значительную часть растворителя через открытый при низкой температуре выход для деления потока, не дискриминируя высококипящие составные части пробы [3.19].

ПТИ может функционировать с делителем или без него. Метод с использованием делителя позволяет вводить большие объемы пробы. Инжектор можно использовать также и без делителя, чтобы обеспечить полный перенос пробы в колонку. При подаче пробы, как с делителем, так и без делителя, после испарения растворителя и перед включением программируемого нагрева ПТИ выход делителя закрывается. При этом все компоненты пробы без потери переносятся на колонку и снова фокусируются, если начальная температура колонки достаточно низка. Этот метод сравним с техникой ввода непосредственно в колонку, но имеет то преимущество, что благодаря испарению растворителя могут вводиться большие объемы проб.

С помощью холодного ввода предотвращают селективное испарение низкокипящих компонентов из иглы шприца и дискриминацию при различном соотношении деления потока. Также удается избежать частичного или полного распада чувствительных к температуре веществ. В случае сильно разбавленных образцов перегрузки детектора или колонки не происходит, так как растворитель испаряется первым и уходит через открытый выход делителя. Конструкция ПТИ делает возможным осуществлять с одним и тем же инжектором как прямой ввод пробы на колонку, так и ПТИ-ввод [3.20].

3.6.4. Ввод пробы с помощью дозирующей петли

Эта техника, известная из ВЭЖХ, находит применение также в газовой хроматографии. Таким образом, например, жидкие газы могут исследоваться без предварительного испарения. В области производственной аналитики дозирующие петли используются в сочетании с автоматическими многоходовыми клапанами для автоматического ввода пробы жидких и газообразных продуктов.

3.6.5. Твердые пробы

Обработка твердых проб едва ли отличается от методов, применяемых для жидких проб. Ввод твердых проб происходит почти исключительно в виде раствора в подходящем растворителе. Для этого особенно подходят шприцы, подающие пробу непосредственно из иглы, так как при этом в шприце не задерживаются остатки раствора.

Особенными методами являются пиролиз и ГХ анализ паровой равновесной фазы. Оба метода подходят как для жидких, так и для твердых проб или компонентов проб. В методе анализа паровой равновесной фазы (англ.: Headspace) анализируется газовая фаза, которая находится в термодинамическом равновесии с твердой или жидкой фазой. Эта специальная техника будет описана позже.

3.6.6. Пиролиз

Все преимущества газовой хроматографии привязаны к принципиальному условию, что вещества должны быть летучими. Для анализа нелетучих веществ пробу можно разлагать пиролитически и анализировать возникающие при этом летучие продукты с помощью ГХ. Под пиролизом понимают тепловое разложение проб или компонентов проб. При пиролизе высокомолекулярных соединений в ходе термического разложения образуются низкомолекулярные соединения. Затем эти продукты исследуются газохроматографически. Пиролитическая ГХ применяется уже более 30 лет для анализа материалов, которые нельзя исследовать с помощью классической газовой хроматографии [3.21]. Пиролиз в комбинации с газовой хроматографией применяется преимущественно для анализа полимеров. При этом можно выделить различные области применения:

- воспроизводимый пиролиз таких высокомолекулярных соединений, как волокна, лаки, полимеры и т.д. Он часто не дает определенных продуктов, и хроматограмма используется как «отпечаток пальцев» продукта;
- воспроизводимый пиролиз соединений со средним и низким молекулярным весом. Он дает определенные продукты, которые определить непосредственно не удастся даже после их дериватизации. К ним относятся неустойчивые соединения, органические соли и т.д.

Пиролиз может происходить в закрытой системе. Продукты после этого можно анализировать. Этот так называемый автономный метод применяется почти исключительно для высокомолекулярных проб или при пиролизе в присутствии кислорода. При on-line методе продукты пиролиза по мере образования переносятся в хроматографическую колонку газом-носителем, проходящим через пиролитическую камеру. В то время как при автономной технике возможно образование продуктов последующих превращений, при on-line технике этот процесс затруднен. Характерные продукты расщепления могут в этом случае идентифицироваться, например, с помощью ИК-детектора с Фурье преобразованием [3.22].

Нагревание пробы при пиролизе происходит за счет подвода к нему внешней энергии. Для этого используется либо электрический нагрев, либо высокочастотная индукция. Поэтому различают два вида пиролиза:

- пиролиз, когда нагрев производится нитью накала, работает с электрической спиралью, температура которой может плавно регулироваться в зависимости от силы тока [3.23]. Это позволяет, например, сначала удалять растворитель или проводить пиролиз постепенно;
- для определенных задач относительно долгое время нагрева может быть недостатком. Так как качественный и количественный составы продуктов пиролиза пробы сильно зависят от условий пиролиза, эти параметры должны быть воспроизводимы очень точно, для чего лучше всего подходит пиролитическая точка Кюри.

Каждый ферромагнитный материал теряет свои ферромагнитные свойства при температуре выше критической и становится парамагнитным. Эта специфическая для материала температура названа точкой Кюри в честь впервые открывшего

ее Пьера Кюри. Пиролиз в точке Кюри использует это специфическое свойство ферромагнитных металлов, таких как железо, кобальт, никель, и их сплавов. Ферромагнитный проводник находится в центре цилиндрической индукционной катушки. Наложением высокочастотного поля в проводнике индуцируется переменное магнитное поле, вследствие чего проводник скачкообразно нагревается вплоть до точки Кюри. При достижении точки Кюри ферромагнетик переходит в парамагнитное состояние. Поглощаемая мощность резко снижается, и температура остается постоянной.

Используя соответствующие сплавы упомянутых металлов и подбирая частоту индукции, можно варьировать температуру пиролиза [3.24]. Кроме того есть ряд сплавов, которые не содержат никаких ферромагнитных компонентов, но, тем не менее, обладают точкой Кюри. Большое преимущество этого метода состоит в том, что в очень короткий период нагревания примерно от 20 до 30 мс всегда воспроизводимо достигается тот же самый профиль подъема температуры и та же самая конечная температура [3.25].

Также как при вводе жидких проб в устройство ввода в хроматографе, пиролиз проводят введением пробы в штуцер реактора и пиролитического инжектора. Пиролизат попадает в поток газа-носителя через иглу устройства ввода пробы. Анализируемые пробы могут вводиться в твердой или жидкой форме. Условием количественного определения при пиролитической ГХ являются стабильные аналитические условия и одинаковая пробоподготовка. При этом удобно работать с внутренним стандартом. Внутренний стандарт – это, как правило, полимер в растворителе. Проба и внутренний стандарт подвергаются пиролизу одновременно [3.26].

Пиролиз ГХ – универсальный метод анализа нелетучих соединений. С помощью этого метода самые разные материалы, такие как природные и синтетические полимеры, полисахариды, целлюлоза, резина или даже органическая соль и другие высокомолекулярные соединения, становятся доступными для газохроматографического анализа [3.27].

3.6.7. Нестабильные образцы

Анализ нестабильных проб возможен тогда, когда процесс разложения воспроизводим и продукты разложения известны. В общем случае, выше определенной температуры всегда необходимо учитывать разложение пробы. Вещества, которые по своей химической структуре склонны к разложению, часто можно проанализировать в ГХ без разложения, если их предварительно подвергнуть дериватизации.

3.6.8. Уплотняющая прокладка инжектора

Правильный ввод пробы посредством шприца зависит от способности уплотняющей прокладки самоуплотняться. Дозирование жидких контрольных веществ или растворов осуществляется, как правило, с помощью микролитровых шприцев. Важную роль при этом, как герметизирующий элемент, играет уплотняющая прокладка.

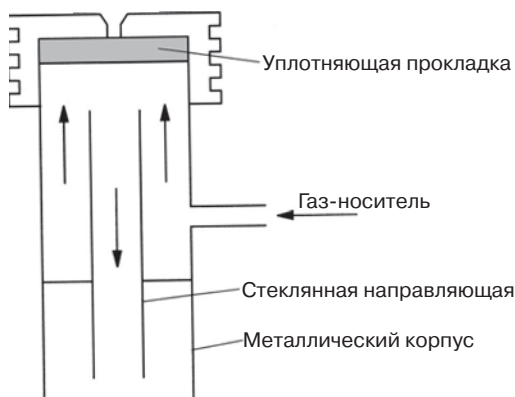


Рис. 3.14. Направление прохождения газа-носителя около уплотняющей прокладки

Уплотняющие прокладки производятся из силиконовой резины с наполнителями, пигментами, смягчителями и специальными добавками (сшиватели). Из упомянутых добавок сшивающий агент и пластификатор могут оказывать мешающее воздействие на поведение анализа. Что касается сшивающих агентов, то речь идет, как правило, об органических пироксидах, которые сокращают содержание мономеров. Пластификаторы необходимы, чтобы придавать мембране необходимую эластичность. При этом речь идет в большинстве случаев об изомерной смеси октил-, децил- и тридецилфталатов.

Проблемы встречаются тогда, когда возникающий при испарении объем пара из-за слишком маленького объема инжектора вступает в соприкосновение с мембраной. При этом пластификаторы и низкомолекулярные полисилоксаны выделяются из мембраны и попадают в пробу, что приводит к появлению мешающих ложных пиков. На рис. 3.14 показано направление прохождения газа-носителя около уплотняющей прокладки. Для предотвращения отмеченного выше эффекта нужно уменьшать объем ввода пробы или увеличивать объем трубки испарителя. Однако при подаче пробы без деления потока это не всегда возможно.

При повышенных температурах инжектора летучие компоненты (мономеры, пластификатор) выделяются из мембраны (газовая экстракция) и переносятся газом-носителем в колонку, где они концентрируются в ее начале. Отсюда появляется ряд проблем:

- компоненты реагируют с анализируемыми веществами;
- сконцентрированные на колонке пластификаторы изменяют разделяющие свойства колонок;
- летучие компоненты прокладки при запуске программирования температуры элюируются из колонки в детектор.

Для предотвращения этих эффектов в некоторых инжекторах предусмотрена промывка мембраны, как это показано на рис. 3.15. Небольшой поток газа-носителя постоянно проходит вдоль мембраны через специальный канал и выходит

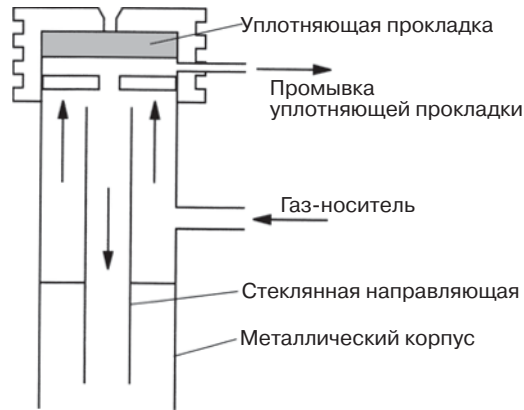


Рис. 3.15. Направление газа-носителя в устройстве с промывкой уплотняющей прокладки

наружу вместе с потоком газа после делителя потока через фильтр с активированным углем.

Термическая стабильность уплотняющих прокладок определяется введенными добавками. Так, в частности, особенно мешают пигменты, так как они вызывают разрушение прокладок. Старые устройства ввода вызывают нагревание прокладок до температуры испарителя. Однако новые системы уже устроены так, что даже при температурах инжектора $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ температуры прокладки не поднимаются выше $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Некоторые производители предлагают так называемую трехслойную мембрану. Они бывают из жесткой, термостойкой и свободной от пластификаторов силиконовой резины, которая обложена с двух сторон мягким, легко закрывающимся слоем силиконовой резины. Такие мембраны и после многих вводов проб хорошо герметизируют инжектор.

Для всех мембран справедливо то, что их нельзя слишком сильно уплотнять, так как иначе они быстро теряют свои полезные свойства. Определяющим для времени жизни прокладок является качество иглы шприца. Толстые, деформированные или тупые иглы очень сильно повреждают мембрану и быстро делают ее непригодной к использованию.

3.6.8.1. Ввод пробы без уплотняющей прокладки

Специальное устройство для ввода пробы позволяет с помощью микролитрового шприца также безупречно и воспроизводимо в автоматизированном долговременном режиме вводить пробу без уплотнений. Потери веществ, характерные для обычного метода работы с неплотными мембранами, и разрушающее действие кислорода больше практически не наблюдаются.

Принцип работы без уплотнений представлен на рис. 3.16. Проба впрыскивается через шлюз специальным микролитровым шприцом. Уплотнение происходит с помощью уплотняющего шарика, который прижимается к уплотнению пружинным механизмом. При вводе пробы шарик прижимается к стенке.

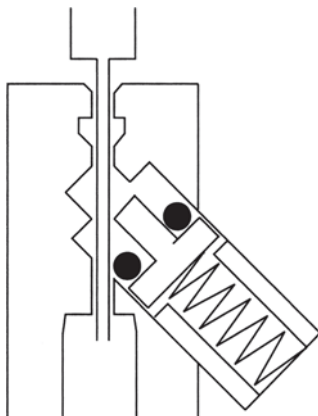


Рис. 3.16. Принцип ввода пробы без уплотняющей прокладки

Преимущества ввода пробы без уплотняющей прокладки:

- дешевле в эксплуатации,
- никаких выделений из прокладки,
- никаких загрязнений входного канала частицами прокладки,
- заметно меньшая опасность разгерметизации.

Недостатки ввода пробы без уплотняющей прокладки:

- высокие расходы при покупке и
- дорогостоящая чистка и обслуживание.

3.7. Газохроматографические детекторы

Коммерческие газовые хроматографы появились в середине пятидесятых годов, и с тех пор центральный блок ГХ состоит из термостатируемого разделяющего блока, термостатируемого детектора и соответствующей электроники. Каждый производитель создает свой хроматограф в виде единого блока и беспокоится о том, чтобы по возможности все важные комплектующие части были собственного изготовления. Конечно, важной частью является детектирующая система, которая, в общем, также предлагается производителями приборов, и, конечно, редко совместима с приборами других производителей. Равным образом основной блок приборов не предусмотрен для того, чтобы его можно было сочетать с любым детектором.

Детектирующая система состоит из собственно «детектора», главного предмета обсуждения, в котором поток элюента из колонки анализируется и генерируется электрически измеряемый сигнал, а также из усилителя сигнала и электрического блока питания. Все компоненты должны оптимально размещаться и соединяться в общем устройстве, и любая замена должна быть возможна только с нормированными и стандартизированными системами. К сожалению, существует мало таких систем.

Потребительскую стоимость детекторной системы определяют не только общие характеристики сигнала. Важными свойствами являются также стабильность сигнала во времени, доступность или частота и легкость обслуживания. Практик

знает, что эти свойства зависят от области применения детектора. Время восстановления всей системы, пробоподготовка, накапливающиеся продукты постепенно саморазлагающихся остатков пробы – все эти факторы оказывают непредсказуемое влияние на поведение детектора.

Было время, когда методы хроматографии не были еще достаточно чувствительными, чтобы эти загрязнения стали проблемой. Но сегодня с помощью высокочувствительных детекторов могут быть обнаружены уже фемтограммовые количества пробы. Источниками этих незначительных количеств может быть проба, а может быть загрязнение из среды лаборатории. Естественно, эта проблема тем больше выходит на первый план, чем выше чувствительность детектора. Поэтому в этом отношении менее проблематичен ДТП, но для ДЭЗ, НДП, ДЭП и МС очень важны условия чистой среды и контролируемых методов работы. Источниками загрязнения может быть, например, воздух, прокладка, растворители, негерметичность в линиях и соединительных деталях.

3.7.1. Основные характеристики детектора

Для анализа на наполненных колонках используются примерно 25 детекторов с разнообразнейшими конструкциями и принципами измерения, в том числе и самый дешевый биологический, а именно: человеческий нос. У человеческого носа находятся в распоряжении примерно 10 000 сенсоров для распознавания запаха и, следовательно, вещества. Общим недостатком является то, что детекторы имеют разную чувствительность к данному веществу. При количественном анализе, чтобы оценивать электрический сигнал, всегда должен учитываться специфический для вещества фактор коррекции.

Измеряемый сигнал может появляться при этом из определения физического свойства смеси компонентов и газа-носителя или одного компонента. В первом случае интенсивность сигнала будет зависеть от концентрации компонента, элюируемого в газе (единица измерения, например, мг/мл), во втором случае – от величины потока массы компонента (единица, например, мг/с).

Поэтому детекторы можно разделить на две категории, а именно: на зависимые от концентрации пробы и зависимые от массы пробы [3.28]. Концентрационная зависимость относится, разумеется, к соотношению количеств газа-носителя и вещества в элюате, точнее, в детекторе, а вовсе не к самой пробе. Концентрационными являются все детекторы, чье действие основано на измерении проводимости, например, проводимости тепла (ДТП) и детектор электронного захвата (ДЭЗ), а также масс-спектрометрические детекторы (МС) и ИК спектрометры с Фурье преобразованием (ИК-Фурье). На изменение массопереноса реагируют все детекторы ионизации, как например, пламенно-ионизационный детектор (ПИД), а также эмиссионные детекторы, такие как пламенный фотометр или микроволновой спектрометр.

3.7.1.1. Концентрационные детекторы

Величина сигнала этих детекторов зависит от концентрации компонента i в потоке газа-носителя. Если рассматривать форму пика, то при более крутом подъеме пика концентрация компонента i в максимуме пика c_{\max} выше и ширина пика мень-

ше. В первом приближении в изотермической хроматографии ширина пика пропорциональна времени удержания. Из этого следует, что при одинаковой ширине пиков более высокое значение c_{\max} будет у пика с меньшим временем удерживания. Величина измеряемого сигнала y_j пропорциональна концентрации c_i , компонента i в каждый момент времени:

$$y_j = f_i c_i = a_i dQ/dV,$$

где f_i – фактор отклика на компонент; Q_i – общая масса компонента i ; V – объем, в котором растворена общая масса Q_i .

Дифференциальное отношение dQ/dV учитывает, что концентрация c_i во время элюирования пика непрерывно изменяется. Площадь пика F_j рассчитывается как интеграл измеряемого сигнала от начальной до конечной точки пика. При разбавлении компонента большим потоком газа-носителя, например, потоком маскирующего газа, концентрация c_i и, следовательно, измеряемый сигнал y_j соответствующим образом уменьшаются.

3.7.1.2. Массовые детекторы

Интеграл измеряемого сигнала компонента i как при больших, так малых потоках газа-носителя не меняется или меняется лишь незначительно, так как интенсивность полученного электрического сигнала зависит только от свойств элюируемого компонента i . Примером тому является пламенно-ионизационный детектор. Сигнал прямо пропорционален количеству ионов, образованных за единицу времени. При этом количество ионов пропорционально массовой концентрации компонента i в пламени. Соответственно величину сигнала можно описать следующим отношением:

$$y_j = a_i Q_j/dt = a_i Q_j.$$

На сигнал массового детектора не влияет подача дополнительного потока газа. Наоборот, чувствительность некоторых специальных конструкций (например, ПИД) даже отчетливо возрастает. В рамках законов физики, тем не менее, существуют границы, когда, к примеру, у ПИД ионизирующие свойства ухудшаются из-за слишком высоких потоков.

3.7.1.3. Дополнительный поток газа

Детекторы, используемые в газовой хроматографии, для оптимальных условий эксплуатации требуют относительно высоких потоков газа. При использовании капиллярных колонок с потоками газа-носителя в несколько мл/мин необходимо подавать в детектор дополнительный поток газа. Этот дополнительный поток газа подается на детектор независимо от потока газа-носителя, так что на поток газа-носителя не влияют количество и вид дополнительного газа. Это важно, так как сигнал детектора может оптимизироваться независимо от газа-носителя, а также его расхода в целом. При оптимальном потоке дополнительного газа поток газа-носителя лишь незначительно влияет на сигнал детектора. Некоторые типичные скорости потоков сведены в табл. 3.3.

Таблица 3.3. Типичные скорости потока детекторов ГХ с маскирующим газом

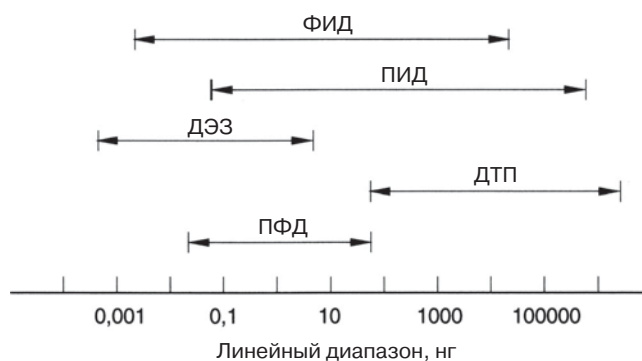
ДТП	15 мл/мин газ-носитель плюс дополнительный газ
ПИД	30 мл/мин газ-носитель плюс дополнительный газ
ДЭЗ	15 мл/мин газ-носитель плюс дополнительный газ

3.7.1.4. Обзор детекторов в ГХ

В ассортименте производителей ГХ есть детекторы, отвечающие самым различным требованиям, из которых можно выбирать в зависимости от поставленной проблемы и необходимой чувствительности обнаружения. Рис. 3.17 показывает линейные рабочие области различных детекторов в ГХ. Наряду с несколькими универсальными детекторами имеются селективные или элементспецифические детекторы. Именно высокочувствительные детекторы, тем не менее, не должны скрывать то, что обнаружению компонента предшествует корректное хроматографическое разделение.

Определение следовых количеств с помощью селективного детектора в не полностью разрешенном пике не дает автоматически правильных результатов.

Выбор типа колонки для ГХ – наполненной или капиллярной – влияет на стратегию детектирования. Капиллярные колонки более инертны, дают лучшие разделения и имеют то преимущество, что направляют элюируемую пробу непосредственно в зону детектора. Таким образом, удастся избежать загрязнений из интерфейса колонка-детектор.

**Рис. 3.17.** Сравнение линейного динамического диапазона различных ГХ детекторов

На рис. 3.18 можно видеть отрицательный эффект электроники детектора, если детектор должен регистрировать узкие, тесно стоящие рядом пики. Так как благодаря совершенствованию техники хроматографии на капиллярных колонках пики выходят быстрее, также было необходимо совершенствование методов детектирования.

Если ширина пика на половине высоты составляет примерно 0,5 с, то сигнал детектора (тонкая линия) соответствует реальному составу элюента (толстая линия). Если, однако, ширина пика меньше (< 0,25 с на половине высоты), то сиг-

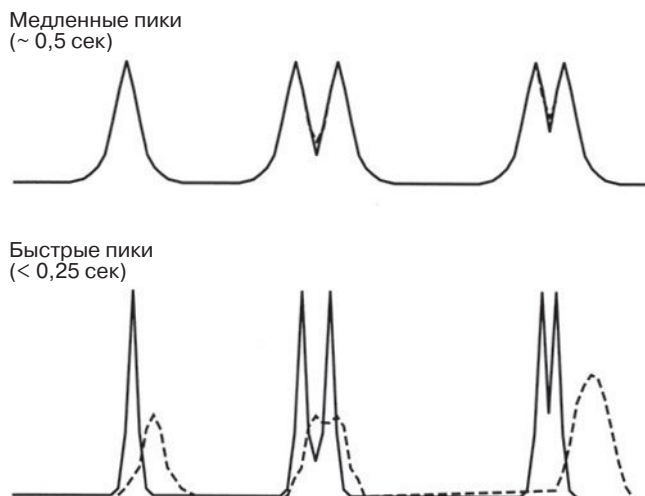


Рис. 3.18. Проблемы скорости обработки данных

нал детектора запаздывает относительно выходящего с колонки элюата и разделенные пики сливаются.

После того как сигнал зарегистрирован детектором, он улучшается с помощью подавления шума электронными фильтрами, и площади пиков рассчитываются тогда с помощью сложных алгоритмов.

Табл. 3.4 снова дает общие характеристики различных детекторов для ГХ. Приведенные значения минимального детектируемого количества могут быть получены при типичных условиях работы детекторов.

3.7.2. Детектор по теплопроводности

Детектор по теплопроводности (ДТП) существовал еще до появления газовой хроматографии, и ячейку по теплопроводности Е. Кремер использовал еще в 1951 году [3.29]. Этот детектор все еще часто используется из-за его простоты, низкой стоимости и универсальности. ДТП реагирует на отличие в теплопроводности веществ, выходящих из колонки, относительно газа-носителя.

Из-за чрезвычайно высокой теплопроводности и химической инертности в качестве газа-носителя рекомендуется гелий. Высокой чувствительности достигают благодаря очень большому отличию в теплопроводности гелия от теплопроводности всех других соединений (за исключением водорода). Другие газы-носители имеют теплопроводность, близкую к теплопроводности исследуемых веществ, поэтому в этом случае чувствительность невысокая.

ДТП состоит из электронагреваемого элемента (электрической спирали сопротивления или термистора) в термостатируемом металлическом блоке. Если вещество присутствует в газе-носителе, теплопроводность уменьшается, и нагревательная спираль теряет меньше тепла. При постоянном напряжении нагревательная спираль становится теплее, и ее сопротивление увеличивается. Это изменение измеряется и записывается (рис. 3.19).

Таблица 3.4. Основные характеристики ГХ детекторов

Название	Тип	Деструктивный	Селективный	Типичное минимальное детектируемое количество (S/N = 2)	Линейный динамический диапазон
ПИД	селективный	да	вещества, ионизируемые в воздушно-Н ₂ -пламени	5 пг С/с	10 ⁷
ДТП	универсальный	нет	все, что имеет теплопроводность, отличную от газа-носителя	400 пг/мл	10 ⁶
ДЭЗ	селективный	нет	электрофилы в газовой фазе	0,1 пг Cl/c в зависимости от структуры	10 ⁴
ПИД	селективный	нет	вещества, которые ионизируются УФ светом	2 пг/с	10 ⁷
АФД	селективный	да	N, P, гетероатомы	0,4 пг 0,2 пг	10 ⁴
ДЭП	селективный	да	галогены, N, S	0,5 пг 2 пг 4 пг	10 ⁶ 10 ⁴ 10 ⁴
ПФД	специфичный	да	P, S	20 пг 0,9 пг	10 ³ 10 ⁴
ИК-Фурье	универсальный	нет	колебания атомов в молекулах	1000 пг для сильно поглощающих соединений	10 ³
МСД	универсальный	да	подходит для любого соединения	от 10 пг до 10 нг (полный ионный ток или сканирование)	10 ⁵
АЭД	универсальный	да	подходит для любого элемента	от 0,1 до 20 пг/с в зависимости от элемента	10 ⁴

ДТП, являясь абсолютно неселективным детектором, имеет большее значение при анализе неорганических (Н₂О) и органических соединений, если не нужна высокая чувствительность. Его часто используют из-за простого обслуживания, так как для его работы необходим только газ. Линейный диапазон детектора

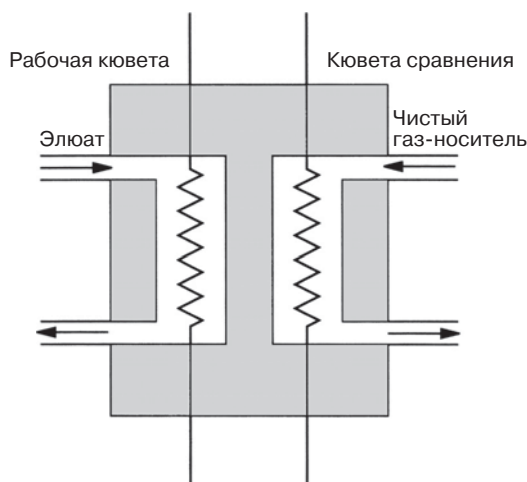


Рис. 3.19. Схематическое изображение ДТП

составляет примерно шесть порядков, и вещества при детектировании не разрушаются. Поэтому можно подключать ДТП в ряд с другими детекторами или собирать вещества в охлаждаемых ловушках для дальнейшего применения.

Первоначальный дизайн ДТП, который сегодня также еще находит применение, содержал мостик сопротивления Уитстона. Различие в теплопроводности между выходящим из колонки потоком газа (газ-носитель и проба) и потоком сравнения (только газ-носитель) вызывает появление напряжения, которое пропорционально различию в теплопроводностях. Напряжение регистрируется и, таким образом, записывается хроматограмма.

Раньше применению ДТП с капиллярными колонками препятствовал миллилитровый объем измерительной камеры. В настоящее время предлагаются детекторы, у которых объем каждой камеры составляет 10 или 20 мкл. С капиллярными колонками средней эффективности этот детектор соединяется непосредственно или с подводом дополнительного газа (например, в соотношении от 2 : 1 до 5 : 1 к объему газа-носителя).

С 1979 года на рынке имеются одноплетенные ДТП с модуляцией, вызываемой потоком газа. В таких устройствах измеряется изменение напряжения, которое необходимо приложить, чтобы поддерживать заданную температуру, когда проба изменяет теплопроводность газа-носителя. Этот вид ДТП разрабатывался специально для работы с капиллярными колонками. При этом потоки газа из аналитической колонки и колонки сравнения попеременно проходят через ячейку с частотой 10 переключений в секунду. Электроника детектора синхронизирует сигналы по фазам, определяет разницу в обоих сигналах и выводит ее в качестве хроматографического сигнала. Так как оба потока измеряются в одной и той же измерительной ячейке с одной и той же нитью накаливания, то разные температуры или состояния нити накаливания не являются источниками помех, как в случае четырехэлементных детекторов. Это делает этот детектор стабильным в работе. При использовании вспомогательной колонкой того же вида, что и измерительная колонка, подавляется также подъем базовой линии в режиме программирования температуры. Для капиллярных колонок, однако, наибольшее значение имеет то обстоятельство, что весь объем измерительной ячейки составляет менее 5 мкл. Вместе с тем, временная характеристика детектора идеальна для настройки на капиллярные колонки. Более новые разработки не нуждаются уже и во второй (сравнительной) колонке.

При выборе температуры детектора должны учитываться чувствительность, время жизни нити накаливания и температуры кипения анализируемых веществ. Низкая температура детектора повышает чувствительность и продлевает жизнь нити накаливания, в то время как высокая температура может быть необходима, чтобы поддерживать газообразное состояние веществ.

Для использования капиллярных колонок с ДТП, с модуляцией, вызываемой потоком газа, необходим дополнительный газ, чтобы заполнить мертвый объем и достичь равновесного потока в канале нити накаливания. Обычные газы для этой цели – это гелий, водород, азот или аргон.

Следует учесть, что чувствительность детектора снижается, если пробы из-за примеси кислорода в газе-носителе реагируют с нитью накаливания. Пробы с активными компонентами, такими как кислоты и галогенсодержащие соедине-

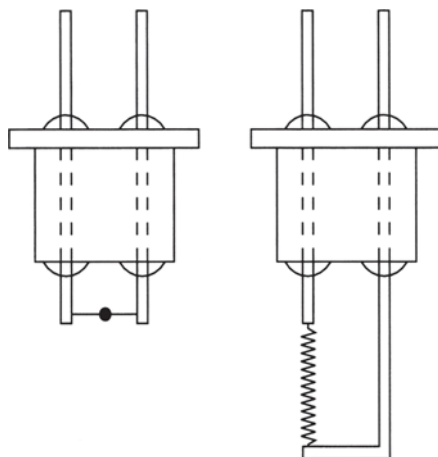


Рис. 3.20. Термисторный и электрический элементы спирали сопротивления

ния, могут химически разрушать нить накаливания. Нити накаливания производились из самых различных материалов: вольфрама, покрытого золотом и, в последнее время, сплавов вольфрама и рения. Нити накаливания могут пассивироваться оксидными пленками, вследствие чего они менее реакционноспособны в присутствии агрессивных проб. К загрязнению детектора приводит также конденсация пробы из-за слишком низкой температуры.

В многих ДТП вместо электрических спиралей сопротивления используются термисторы. Они сделаны из агломерированных смесей оксидов марганца, кобальта и никеля с добавлением некоторых микроэлементов для достижения желаемых электрических свойств.

В противоположность металлам термисторы обладают высоким отрицательным температурным коэффициентом, что отрицательно сказывается на чувствительности при высоких температурах. Термистор в форме маленького шарика монтируется на платиновых нитях и покрывается стеклом для инертности. Преимущество термисторов состоит в большей чувствительности по сравнению с нитями накаливания при рабочих температурах ниже $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, но чувствительность сильно падает с ростом температуры. В зависимости от конструкции объемы измерительных ячеек детектора могут быть очень маленькими, как видно из рис. 3.20.

ВЫВОД

ДТП – это неселективный универсальный детектор, который особенно часто используется в анализе газов. Он работает стабильно со средней или хорошей чувствительностью, его просто использовать. Он, однако, нуждается в стабильном потоке газа-носителя, а также постоянной температуре и напряжении. Измерение происходит без разрушения пробы.

3.7.3. Пламенно-ионизационный детектор

Ионизационные детекторы основаны на факте, что электрическая проводимость газов пропорциональна концентрации электрически заряженных частиц в этих газах.

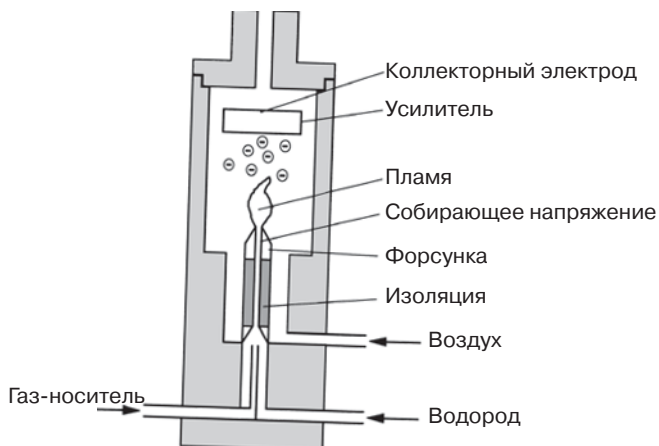


Рис. 3.21. Пламенно-ионизационный детектор

Пламенно-ионизационный детектор (ПИД) был разработан в 1957 году Дж. Г. Мак-Вильямом и Р. А. Дьюаром [3.30]. Это предпочтительный детектор для анализа следовых количеств большинства органических соединений.

Соединения сгорают в пламени водородной горелки и образуют электрически заряженные частицы. Форсунка играет роль катода. Непосредственно над ней расположен электрод-коллектор в качестве анода (рис. 3.21). Изменение электрического тока нарушает баланс моста Уитстона. Электроника отслеживает изменение и записывает сигнал.

ПИД реагирует на все «сжигаемые», т.е. ионизируемые водородным пламенем, компоненты. Наряду с этим ПИД реагирует также на определенные «негорючие» контрольные вещества, которые, тем не менее, легко ионизируются благодаря своей химической структуре (например, галоидсодержащие углеводороды). Величина сигнала ПИД для углеводородов непосредственно зависит от количества атомов углерода. ПИД не чувствителен к веществам, которые в пламени не ионизируются или ионизируются лишь незначительно (например, благородные газы, кислород, азот, окись углерода, двуокись углерода и вода).

ПИД имеет очень малую постоянную времени и, таким образом, быстро реагирует на появление пиков. Благодаря большому динамическому диапазону (примерно семь порядков) он применяется также для измерения больших концентраций. Вещества, однако, разрушаются при детектировании.

ПИД — ровесник коммерческих ГХ; с момента его изобретения он благодаря своим возможностям стал эталоном ожидаемого хроматографического поведения и оказал глубокое влияние на обе части хроматографической системы — на разделительную систему и систему детектирования. Применение капиллярных колонок было бы невозможно без ПИД. Собственно, с момента его изобретения не так много нужно было дорабатывать в детекторе, так как носитель сигнала, диффузионное водородное пламя, технически просто поддается управлению. Но вместе с тем, чтобы реализовать возможности заложенные в ПИД и, естественно, также во всех других ионизационных детекторах, потребовались значительные уси-

лия по разработке электронных усилителей и источников питания с уменьшенным дрейфом и шумом.

В современных, управляемых микропроцессором усилителях сигнал детектора собирается в определенные временные интервалы (например, каждые 20 мс у приборов, работающих на частоте 50 Гц). Соответствующие величины напряжения после усиления оцифровываются и поступают для обработки на интегратор и в то же время параллельно, после сглаживания шумов, поступают на самописец.

Измерительная ячейка ПИД, которой является водородное пламя, постоянно регенерируется, поскольку измеряемые углеводороды сжигаются с образованием газообразных конечных продуктов, которые не могут загрязнять измерительную ячейку. Тепловые колебания (рабочая температура пламени примерно 2000 °С) или колебания потока газа-носителя будут лишь незначительно влиять на стабильность измерения. Однако предпосылкой для чувствительной работы детектора является использование достаточно чистых газов (< 0,1 мд углеводородов), предотвращение загрязнения потока перед детектором и недопущение присутствия в разделяемой пробе компонентов, которые при сгорании приводят к образованию твердых остатков. Длительная эксплуатация ПИД в сочетании с автодозаторами или в хроматографическом анализе на производстве требует также контроля за водородным пламенем.

С помощью подключения реакторов ПИД может быть в высшей степени чувствительным детектором и для таких постоянных газов, как СО, СО₂ или кислород, а также кислородосодержащих соединений. Если перед ПИД используют гидридный реактор (метанатор) с каталитически активным Ni при 450 °С и используют как газ-носитель Н₂, то с высокой чувствительностью можно обнаружить СО и СО₂. Такой детектор обладает двумя конвертерами перед ПИД: в первом при температуре около 1300 °С углеводороды и кислородосодержащие углеводороды разлагаются на углерод, Н₂ и СО (соответственно содержанию кислорода). СО превращается затем в гидрирующем реакторе в СН₄ и обнаруживается благодаря чувствительности ПИД. Тем самым ПИД превращается в кислородспецифический детектор [3.31].

ВЫВОДЫ

ПИД – это ионизационный детектор с хорошей или очень хорошей чувствительностью к почти всем органическим соединениям. Стабильность очень хорошая, низкие эксплуатационные расходы, прост в уходе и обслуживании. Со специальными дополнительными устройствами открываются другие области применения. Анализируемые вещества при измерении разрушаются.

3.7.4. Детектор электронного захвата

Детектор электронного захвата (ДЭЗ) возник из устройства, которое доктор Джеймс Лавлок разработал в 1948 году, чтобы измерять самые маленькие потоки воздуха. В это время он исследовал грипп и установил, что сигаретный дым и хлорированные углеводороды мешают устройству функционировать. В 1958 году Лавлок сконструировал первый тогда детектор ионизирующего излучения [3.32], а первый детектор электронного захвата разработал совместно с С. Р. Липским в 1960 году [3.33].

Сегодня ДЭЗ применяется преимущественно для анализов пестицидов из-за его чувствительности к галогенам [3.34].

ДЭЗ – это ионизационный детектор, который обладает повышенной избирательностью к электрофильным веществам; вместе с тем, он является селективным детектором галоидсодержащих соединений, нитрилов, нитратов и сопряженных карбониллов. Напротив, он почти нечувствителен к чистым углеводородам, спиртам, кетонам и т.д. Электрофильные материалы, т.е. соединения с высоким сродством к электрону, как, например, средства защиты растений (галоидсодержащие углеводороды), селективно определяются с более высокой чувствительностью.

ДЭЗ – в противоположность ПИД – измеряет уменьшение сигнала вместо его увеличения. Электрод состоит из облучателя на основе Ni-63 и излучает электроны (β -излучатель). Поток электронов дает слабый ток, который измеряется при этом на коллекторном электроде. Когда молекулы пробы достигают ячейки, они захватывают электроны, которые иначе достигли бы коллектора и вызвали определенный ток (рис. 3.22). Обусловленное этим уменьшение тока – это основа для количественного применения метода.

Развитие в высшей степени чувствительного к электрофильным материалам ДЭЗ, улучшившего его применение, произошло в два основных этапа: от режима постоянного напряжения к импульсному режиму и затем к импульсному режиму постоянного тока с частотной модуляцией. При первом режиме работы напряжение на коллекторе оставалось постоянным. Более современные разработки используют импульсное напряжение, чтобы увеличивать динамический диапазон, и поддерживают в ячейке постоянную частоту или напряжение.

Приложенное к электродам импульсное напряжение способствует тому, что не захваченные электрофильными веществами электроны периодически собира-

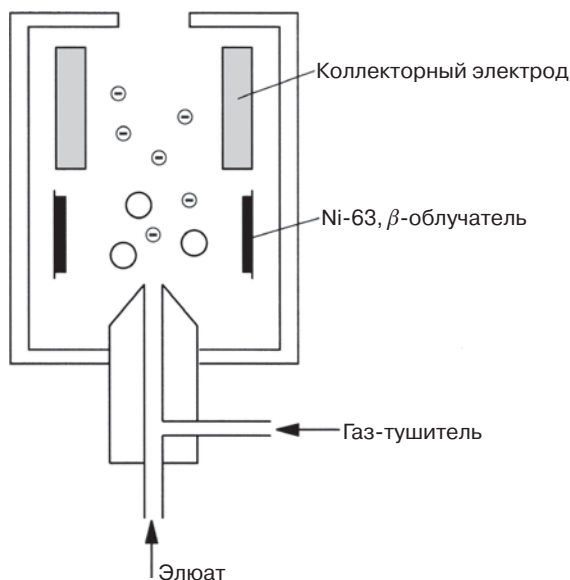


Рис. 3.22. Детектор электронного захвата

ются коллектором. Благодаря этим импульсам регистрируются только свободные электроны, так как более тяжелые отрицательные ионы не могут достичь за этот короткий срок электрода и удаляются несущим газом из ячейки детектора.

Как детектор, не разрушающий пробы, ДЭЗ подходит для сочетания с другими детекторами. Избирательность зависит от сродства соединений к электрону. Органические полигалогениды — это соединения с очень высоким сродством к электрону. ДЭЗ менее чувствителен к соединениям, содержащим кислород, фосфор или ароматические кольца. Многие соединения, такие как парафины и простые углеводороды, не способны захватывать электроны и не детектируются ДЭЗ.

Поверхность ячейки покрыта радиоактивным источником, Ni-63, и имеет в среднем активность 15 милликюри. Использование радиоактивных источников регламентируется многими правительствами. Поэтому при работе нужно обращать внимание на соответствующие нормативы.

Предел температуры для этого детектора составляет примерно 400 °С. Обыкновенными газами-носителями для ДЭЗ являются азот или аргон с 5% метана. С метаном (газ-тушитель), вследствие энергопонижающих столкновений, производится больше электронов с малым запасом энергии.

ВЫВОДЫ

ДЭЗ обладает исключительно низким значением пороговой чувствительности к электрофильным соединениям. Использовать его сложно, так как он чувствителен к следам воды или кислорода и легко загрязняется.

3.7.5. Азотно-фосфорный детектор

Азотно-фосфорный детектор (АФД — известен также как ионно-термический детектор) использует форсунку и коллектор подобно ПИД. Этот детектор селективен к богатым азотом и фосфором соединениям, так как над форсункой расположен кристалл щелочной соли (в большинстве случаев, рубидия) (рис. 3.23). В при-

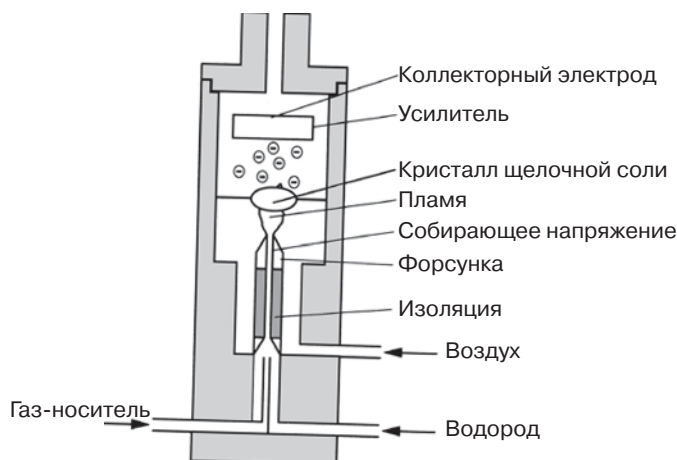


Рис. 3.23. Азотно-фосфорный детектор

существовании этого ионно-термического источника N- и P-содержащие органические молекулы ионизируются с высоким выходом. Ионы собираются, и возникающий ток измеряется. АФД очень ценен в клинической химии и анализе пестицидов, так как, благодаря его селективности, отпадают дорогие и требующие много времени этапы экстракции и концентрирования. Он применяется специально для обнаружения и определения наркотиков [3.35].

Детектор может использоваться в двух разных режимах работы, которые отличаются в соответствии с температурой пламени.

NP-РЕЖИМ

Контрольное вещество сжигается в водородном пламени лишь частично. Чтобы минимизировать ионизацию нормальных углеводородов, пламя поддерживают при меньшем расходе воздуха и водорода, чем при ПИД. При этом возникают электрофильные промежуточные продукты, которые захватывают свободные электроны из электронагреваемой стекловидной соли рубидия. Образующиеся в результате ионы устремляются к электроду-коллектору и там поглощаются. Базовый ток на электроде возрастет, усиливается электронным усилителем и записывается как измеряемый сигнал. Дополнительно ионы щелочного металла могут вводиться в пламя, чтобы увеличивать ионизацию N- и P-содержащих веществ. Тем самым, АФД является селективным детектором к органическим соединениям, содержащим азот и/или фосфор. Неорганический азот как N_2 или аммиак детектироваться не будут. В этом режиме работы детектор обладает одинаковой чувствительностью к азоту и фосфору.

P-РЕЖИМ

В очень горячем водородном пламени анализируемое вещество сгорает полностью. Продукты сгорания фосфора реагируют со щелочным металлом стекловидной соли. При этом образуются ионы, которые соответствующим образом определяются. В этом режиме работы детектор обнаруживает специфическую чувствительность только к фосфору.

ВЫВОДЫ

АФД очень похож на ПИД с той разницей, что в центре пламени расположена частица соли щелочного металла. Он является чувствительным и селективным детектором для P- и N-содержащих соединений. Так как АФД детектирует следовые количества, нужно обращать серьезное внимание на то, чтобы не было загрязнения аналитической системы, например, фосфатсодержащими чистящими средствами. Даже сигаретный дым записывается уже на расстоянии 30 м! АФД очень хорошо подходит для актуальной темы анализа азотсодержащих гербицидов и пестицидов в воде [3.36].

3.7.6. Пламенно-фотометрический детектор

Пламенно-фотометрический детектор (ПФД) позволяет чувствительное и селективное обнаружение сера- и/или фосфорсодержащих контрольных веществ. Поэтому он очень актуален в области биохимии, химии пищевых продуктов и окру-

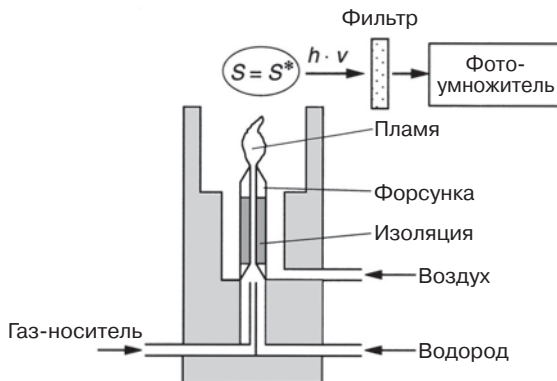


Рис. 3.24. Пламенно-фотометрический детектор

жающей среды. Необходимость в трудоемкой пробоподготовке отпадает. Это делает ПФД очень популярными [3.37].

У ПФД используется тот факт, что сера- и фосфорсодержащие углеводороды в ходе реакции сгорания, т.е. в пламени, подобном ПИД, образуют хемилуминесцирующие частицы. Возбужденные молекулы испускают свет определенной длины волны, которая является характерной для элементов в пробе. Оптический фильтр пропускает только свет с определенной длиной волны к приемнику (фотоумножителю), и присоединенная электроника выдает сигнал (рис. 3.24).

Химические реакции внутри и около пламени очень сложны и тесно связаны с потоком газа и температурой. При этом образуются возбужденные молекулы $S=S^*$ из соединений серы и возбужденные частицы HP^* из соединений фосфора [3.38]. Эти метастабильные промежуточные продукты теряют при разрушении энергию в форме фотонов со специфической длиной волны, которая лежит для серы при 394 нм и для фосфора при 526 нм. Излучение выделяется оптическим фильтром и регистрируется фотоумножителем и записывается после электронного усиления как измеряемый сигнал. В старых приборах каждый раз должен был применяться соответствующий фильтр. Более новые конструкции обладают двумя фильтрами и умножителями и делают возможным, таким образом, одновременное детектирование серы и фосфора.

Из-за реакции серы в пламени (образование $S=S^*$) количество испущенного света не линейно связано с концентрацией атомов серы, а приблизительно пропорционально квадрату концентрации атомов серы. Осложнением для количественного определения, как правило, является высокая полярность анализируемых веществ. Многие серасодержащие газы легко адсорбируются в хроматографических колонках или в соединительных деталях. Это ведет к сильно несимметричным пикам, которые затрудняют правильное количественное определение [3.39].

Следующая проблема — это так называемое тушение. Если в детектор вместе с оксидом серы попадает, например, не серасодержащее органическое соединение, то могут иногда наблюдаться сильные помехи, например, потеря чувствительности или обращение пиков.

ВЫВОДЫ

ПФД обладает хорошей чувствительностью и прост в использовании. Область применения, однако, ограничена вследствие неоднородного нелинейного отклика детектора.

3.7.7. Детектор по электролитической проводимости

Детектор по электролитической проводимости (ДЭП) – это детектор, который был разработан не так давно и очень полезен в области экологического анализа благодаря его чувствительности к галогенированным соединениям [3.40].

С ДЭП можно избирательно обнаруживать галоген-, сера- или азотсодержащие соединения. Этого достигают, смешивая в реакционной ячейке (обычно из никеля) разделенные компоненты с реакционным газом, который, в зависимости от проводимого анализа, действует как окислитель или восстановитель. Конечный продукт смешивается с деионизированным растворителем, при этом получают проводящий раствор. Проводимость измеряется и записывается (рис. 3.25).

В случае анализа галогенсодержащих соединений компоненты, выходящие из колонки, восстанавливаются в никелевой ампуле водородом при 850 °С, причем образуется сильная кислота (например, HCl из хлорсодержащих соединений). Этот газообразный продукт растворяется затем в н-пропаноле, и измеряется изменение проводимости растворителя.

Другие продукты реакции являются не такими ионными и поэтому в слабокислом растворителе н-пропаноле не ведут к увеличению проводимости.

Для трудновосстанавливаемых соединений, как, например, ПХБ, необходимы более высокие температуры реактора (950 °С). Газ-носитель и газ-восстановитель водород должны быть очень чистыми, чтобы гарантировать свободное от

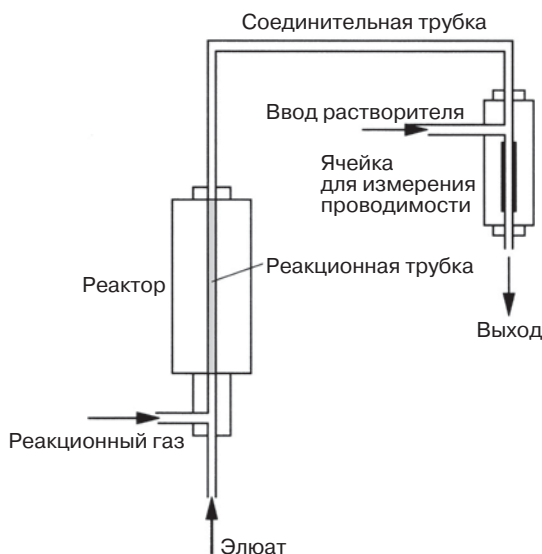


Рис. 3.25. Принцип детектора электролитической проводимости

шума, чувствительное проведение анализа. Растворитель должен быть очищен на ионообменной смоле, чтобы гарантировать постоянную проводимость.

С помощью разных растворителей и газов ДЭП может детектировать также другие гетероатомы. Хотя самая употребительная версия – это обнаружение галогенов, хороших результатов [3.41] можно достичь также с детекторами, чувствительными к сере и к азоту.

3.7.8. Фотоионизационный детектор

С 1976 года коммерчески доступны детекторы фотоионизации (ФИД). Они очень популярны из-за их чувствительности к ароматическим углеводородам и неорганическим соединениям, а также из-за их неструктурного действия [3.42].

Принцип действия ФИД основывается на том, что молекулы пробы ионизируются путем поглощения ультрафиолетового света. Образующиеся заряженные частицы улавливаются между двумя электродами, к которым приложено напряжение от 50 до 200 В (рис. 3.26). Измеряемый ионный ток пропорционален концентрации анализируемых компонентов в диапазоне более семи порядков, причем граница обнаружения у ФИД иногда лежит ниже, чем у ПИД.

Чем выше энергия возбуждения, тем более универсально происходит ионизация, т.е. селективность детектора может задаваться источниками излучения. Детектор подобен ПИД с тем дополнительным преимуществом, что обладает большей селективностью. Используемая лампа задает энергию фотонов и, тем самым, определяет также соединения, которые можно детектировать, так как каждое соединение обладает своим собственным потенциалом ионизации.

Доступны лампы с 8,3, 9,5, 10,2 и 11,7 эВ. Это соответствует области длин волн от 147 нм (8,3 эВ) до 104 нм (11,7 эВ). В табл. 3.5 указано несколько примеров потенциалов ионизации. Если используют лампу со средней энергией (10,2 эВ), то соединения с высокими потенциалами ионизации возбуждаются незначительно.

ФИД состоит из ультрафиолетовой лампы и ионизационной камеры. Лампа наполнена газом (обычно аргоном или водородом), который производит характерную линию эмиссии в возбужденном состоянии. Излучение проходит через

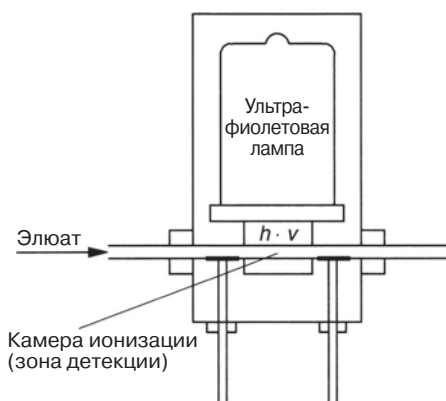


Рис. 3.26. Фотоионизационный детектор

Таблица 3.5. Потенциалы ионизации различных соединений

Азот	15,6 эВ
Монооксид углерода	14,0 эВ
Метан	13,0 эВ
Диоксид углерода	12,8 эВ
Вода	12,6 эВ
Кислород	12,1 эВ
Хлор	11,5 эВ
Этан	11,5 эВ
1,2-дихлорэтан	11,1 эВ
Аммиак	10,3 эВ
Гексан	10,2 эВ
Бензол	9,3 эВ
Толуол	8,8 эВ

окно из фторида металла в ионизационную камеру или ячейку. Ионы улавливаются электродом, и измеряемый ток пропорционален концентрации пробы.

Лампа и окно выбирают соответственно потенциалу ионизации измеряемого соединения. От этого зависят селективность и чувствительность.

ВЫВОДЫ

ФИД обладает очень высокой чувствительностью, стабильностью, большой линейной областью измерения и прост в использовании. Однако применим исключительно для органических соединений ввиду их относительно невысоких потенциалов ионизации.

3.7.9. Детектор дальнего УФ диапазона

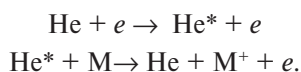
Поглощение энергии, которое ведет к фотоионизации, можно использовать как метод измерения также в оптическом детекторе, для чего предлагается детектор дальнего УФ диапазона. Детекторы поглощения ультрафиолета в спектральном диапазоне от 160 нм были известны уже в 70-е годы, но без значительного коммерческого интереса из-за незначительных возможностей приложения в этом спектральном диапазоне. Сегодняшние детекторы в дальней УФ области работают в спектральном диапазоне от 120 нм (10,2 эВ облучателя), что делает их практически универсальными, за исключением детектирования благородных газов, так что гелий может использоваться как газ-носитель. Также никому больше не нужен спектрофотометр. Вместо него используется ультрафиолетовый фотодиод, который делает возможным детектирование в узком диапазоне длин волн при низком темновом токе. Это обеспечивает высокую чувствительность детектора.

Чувствительность определяется коэффициентами поглощения вещества, знание которых, в свою очередь, позволяет определить величину отклика детектора и границы обнаружения соединения. Таким образом, например, для углеводородов граница обнаружения близка к таковой для ДТП, однако в десять раз хуже, чем у ПИД.

3.7.10. Гелиевый ионизационный детектор

Высокопроизводительный ионизационный гелиевый детектор (ИГД) разрабатывался в 50-ые годы для определения следовых примесей в постоянных газах. Он является ионизирующим детектором и работает подобно детектору фотоионизации [3.43]. Вместо ультрафиолетового излучения ионизация веществ происходит с помощью β -облучателя. Комбинация β -облучателя и большого градиента электрического поля (4000 В/см) переводит газ-носитель гелий в метастабильное состояние с потенциалом ионизации 19,8 эВ. Все анализируемые вещества с меньшим потенциалом ионизации при этом ионизируются и увеличивают тем самым ток анода. Потенциалы ионизации нескольких соединений указаны в табл. 3.5. ИГД, таким образом, использует то обстоятельство, что ионизация усиливается, если посторонний газ примешивается к благородному газу, находящемуся под постоянным облучением [3.44]. Однако точный механизм еще полностью не ясен, хотя в прошлом на этом пути были достигнуты определенные успехи [3.45].

Механизм, вероятно, основан на переносе энергии от метастабильного гелия на другие атомы или молекулы. Гелий протекает через детектор как газ-носитель. β -лучи ионизируют часть атомов гелия. При этом вторичные электроны ускоряются до определенной энергии с помощью приложенного напряжения, чтобы в свою очередь перевести неионизированный гелий в метастабильное, но не ионизированное состояние. Так как энергия возбуждения метастабильного гелия больше, чем потенциал ионизации всех других соединений (за исключением неона), он может ионизировать при соударении почти все компоненты. Возникающие при этом ионы улавливаются электродом коллектора, что и определяет ток ионизации. Поэтому ИГД является универсальным детектором.



М символизирует здесь все атомы или молекулы, кроме гелия. Хотя согласно этим уравнениям должен был бы возникать только положительный сигнал, отрицательные и даже биполярные сигналы также регистрируются в зависимости от типа соединения и его концентрации.

Для ИГД необходим исключительно чистый гелий (99,9999%), так как детектор очень чувствителен ко всем чужеродным атомам. На самом деле ИГД для того и разрабатывали, чтобы контролировать процессы очистки гелия. Очистку гелия можно провести, в простейшем случае, с помощью колонки, наполненной молекулярными ситами и охлаждаемой жидким азотом. Сегодня ИГД применяется для анализа следов постоянных газов как неспецифический детектор с высокой воспроизводимостью и чувствительностью. ИГД, таким образом, похож универсальностью применения на ДТГ, но только, разумеется, для области следовых и ультраследовых количеств.

3.7.11. Редокс-хемилюминесцентный детектор

Редокс-хемилюминесцентный детектор (РХД) разрабатывался в конце 70-х годов для количественного определения соединений азота, водорода или серы в воде

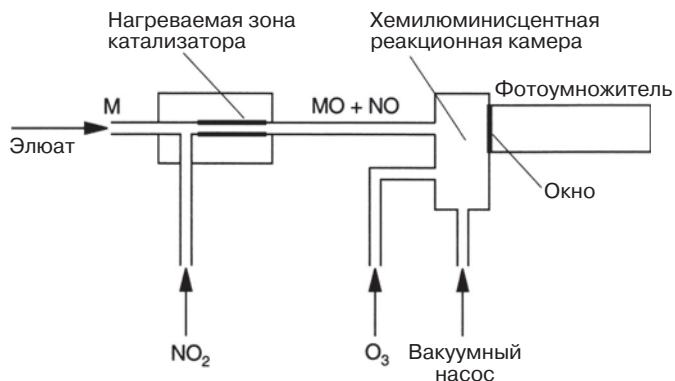
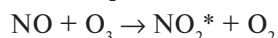
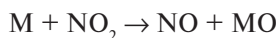


Рис. 3.27. Схема редокс-хемилюминесцентного детектора

или воздухе. Как правило, для анализа используется реакция озона с монооксидом азота [3.46].

Элюат из колонки смешивается в РХД с реагентами, чтобы образовалось соединение, которое лучше детектируется, чем аналит. В данном случае это соединение, излучающее свет, а именно: возбужденная NO_2^* .



Разделенные вещества смешиваются с двуокисью азота и восстанавливают его до монооксида азота. В качестве катализатора применяют золото. Затем NO смешивается в реакционной камере при пониженном давлении с озоном, чтобы получить электронновозбужденную двуокись азота NO_2^* . Испускаемые при переходе в невозбужденное состояние кванты света регистрируются (рис. 3.27). Эмиссия пропорциональна полученному NO и регистрируется с помощью фотоумножителя.

К соединениям, которые можно определять с помощью РХД, принадлежат спирты, альдегиды, кетоны, кислоты, фенолы, олефины, ароматические углеводороды, амины, тиолы, сульфиды и фосфонаты [3.47]. РХД дополняет ПИД, так как много соединений, которые не дают сигнал ПИД, действуют как восстановители и могут быть таким образом обнаружены.

3.8. Комбинированные методы газовой хроматографии

Все чаще хроматографические методы и спектроскопические методы детектирования сочетают друг с другом для идентификации неизвестных пиков [3.48]. ГХ-МС (газовая хроматография-масс-спектрометрия) и ГХ/ИК Фурье (газовый хроматограф/инфракрасная Фурье спектроскопия) очень полезны для идентификации компонентов в пробе. В течение последних двух десятилетий для качествен-

ного анализа время удерживания в ГХ все больше и больше заменяют данными по ГХ/МС. Ранее этот вид качественного анализа был даже дополнен инфракрасными спектрами поглощения. Более того, значительные успехи в развитии аналитических приборов позволили очень просто получать одновременно данные ГХ-МС и ГХ/ИК-Фурье после одного ввода пробы.

Методом, чаще всего применяемым для характеристики хроматографических пиков, является масс-спектрометрия. Этот метод служит не только для установления структуры неизвестных веществ, но и для идентификации и количественного анализа известных соединений в сложных матрицах в области фемтограмм. Учитывая эти уникальные возможности, сочетание ГХ-МС нашло широкое распространение в ГХ. Тем не менее, есть некоторые задачи, в которых данных по масс-спектрам недостаточно. Некоторые из этих проблем можно решить с помощью ИК-спектров.

При сравнении масс-спектрометрии и инфракрасной спектроскопии важно указывать, что они взаимно дополняют друг друга. Сила ИК-спектроскопии – в ее способности давать качественную информацию по расположению и интенсивности полос, которые обусловлены пространственными колебаниями, а именно: вибрационными и деформационными колебаниями молекул. С помощью ИК-спектроскопии можно определять различия молекулярной геометрии и пространственного расположения и, таким образом, отличать изомеры. Слабости масс-спектрометрии проявляются при непосредственном распознавании изомеров. С другой стороны, молекулярный вес нельзя определить непосредственно из ИК-спектра, но очень часто можно определить из масс-спектра. Так как масс-спектрометр проявляет селективность к массам, то это дает очень полезные сведения для проб, которые содержат, например, компоненты ряда гомологов. Для таких задач данных ИК-спектрометрии иногда недостаточно, особенно для проб высокой молекулярной массы.

Комбинация газовой хроматографии с атомно-эмиссионной спектроскопией представляет собой очень селективный многоэлементный детектор. Колоночный элюат в индуцированной микроволнами плазме полностью разлагается на атомы и ионизируется, причем каждый элемент испускает свет в форме характеристических линий, которые регистрируются спектрометром. При этом для каждого элемента получается собственная хроматограмма, что позволяет определять элементный состав индивидуальных веществ.

3.8.1. Масс-спектрометр

В то время как на хроматограмме, полученной с пламенно-ионизационным детектором (ПИД), интенсивность пиков пропорциональна количеству ионов, молекула в масс-спектрометрическом (МС) детекторе разлагается на фрагменты, которые характерны для данной молекулы и поэтому позволяют сделать выводы о ее структуре. При сочетании МС с ГХ элюат нужно направлять непосредственно или через интерфейс в МС-источник ионов, который находится под высоким вакуумом. Чтобы необходимый для получения безупречных масс-спектров вакуум не падал, в МС нужно направлять только небольшой поток газа. Оба типа ГХ коло-

нок, наполненные и капиллярные, совместимы с МС. При применении наполненных колонок для сокращения количества газа-носителя, попадающего в МС, на сочленении ГХ и МС требуется установить сепаратор. Наполненные колонки, однако, редко применяются для техники ГХ/МС.

В масс-спектрометре молекулы «бомбардируются» в газовой фазе электронами, как правило, с энергией ионизации 70 эВ. При этом говорят об ионизации электронным ударом (ЭУ). Вначале из молекулы выбивается электрон, возникает положительно заряженный молекулярный ион. Избыточная энергия молекулы ведет к распаду химических соединений на молекулярные ионы. Расщеплением и процессами перегруппировки получают характерный для соответствующего вещества масс-спектр. Многие вещества фрагментируются незначительно и, таким образом, дают очень интенсивный молекулярный ион. Отсюда легко определить молекулярную массу.

Альтернатива этого процесса, а именно захват электрона молекулой газа с образованием отрицательно заряженного ион-радикала, в 100 раз менее вероятно. Поэтому преимущественно наблюдаются масс-спектры положительных ионов.

Если положительно заряженные фрагменты ускоряют в магнитном поле, то они перемещаются по искривленным траекториям, радиусы которых пропорциональны квадратным корням из массы ионов (сила Лоренца):

$$m/e = \frac{H^2 \cdot r^2}{2 \cdot V},$$

где H – сила магнитного поля; r – радиус круговой траектории, по которой движется ион; V – ускоряющее напряжение.

При постоянном магнитном поле каждый ионный пучок содержит ионы с одинаковым отношением массы к заряду, которые затем направляются на коллектор. Заряженные ионы вызывают появление электрического тока, величина которого пропорциональна относительному количеству ионов соответствующей массы.

Путем изменения магнитного поля все соотношения массы к заряду последовательно направляются на коллектор. Возникающий ток последовательно регистрируется и дает масс-спектр. На рис. 3.28 представлен принцип масс-спектрометрии в магнитном поле

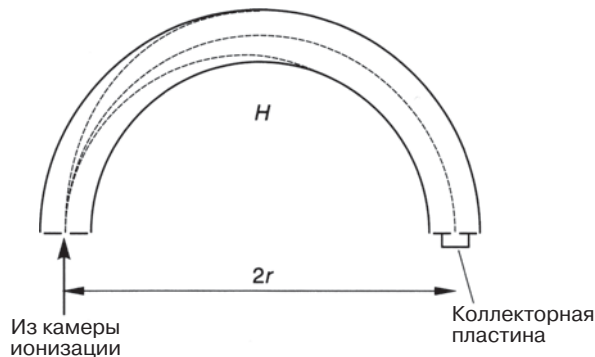


Рис. 3.28. Принцип масс-спектрометрии в магнитном поле

метра с магнитным полем, при котором магнитное поле направляет пучки ионов по различным траекториям в соответствии с отношением массы к заряду. Масс-спектрометры с постоянным магнитным полем обладают отличным разрешением по массам, однако они имеют значительные размеры и очень дороги. Для многих аналитических задач в газовой хроматографии экстремальное разрешение по массам вовсе не требуется. В этом случае предпочтение отдают другим, более простым и, вместе с тем, существенно менее дорогим масс-детекторам.

Масс-спектрометры как детекторы ГХ стали вообще более доступными при последовательном развитии квадрупольной МС и систем обработки данных. В настоящее время есть две системы, которые предлагаются как детекторы для ГХ:

- масс-селективный детектор (MCD) и
- ионная ловушка (ITD).

По их цене они доступны также для средних лабораторий. Масс-спектрометры могут регистрировать по полному ионному току или ионному току для выбранной массы обычную хроматограмму и являются практически универсальными ионизационными детекторами, так как при энергии активации 70 эВ в устройстве с электронным ударом (electron impact) все представляющие интерес соединения ионизируются. Высокая степень ионизации у этих детекторов означает высокую чувствительность, а возможность разделения по массам — уникальную селективность.

Масс-спектрометр принципиально может заменить все обычные детекторы.

Собственная масс-спектрометрическая информация, масса молекул или их фрагментов — это важный параметр для качественного анализа, который может выполняться на рутинном уровне путем сравнения масс-спектра, полученного при анализе со стандартными спектрами. Такую возможность дают системы обработки данных — базы данных с соответствующим программным обеспечением и наборами спектров для сравнения.

У квадрупольных приборов разделение ионов по соотношению массы к заряду происходит в переменном электрическом поле между стержнями квадруполья. Первый шаг в ГХ/МС анализе — это сканирование всей области масс. Так как капиллярная колоночная хроматография дает ГХ пики с очень маленькой полушириной, требуется очень высокая скорость сканирования, обычно 2 скана/с. Способность квадрупольных приборов осуществлять быстрое сканирование по массам способствовало их внедрению в практику ГХ анализа.

Все полученные во время хроматографического разделения масс-спектры запоминаются в памяти блока обработки данных. В режиме реального времени можно получать хроматограмму общего ионного тока или ионного тока частиц определенной массы, иногда параллельно со стандартным ГХ детектором. При последующей обработке данных логическая взаимосвязь отдельных масс с пиками может выводиться в виде хроматограммы или в виде числовых значений. Но самой важной задачей обработки данных является сравнение спектров. В результате в библиотеке будут найдены спектры, больше всего похожие на только что полученные, то есть практически предложена структура вещества.

ГХ-МС система включает газовый хроматограф, масс-спектрометр, базу данных, программное обеспечение для обработки данных и библиотеку спектров. При все более высокой мощности этих систем анализов цена измерений также сократилась. МСД и ионная ловушка достигли размеров ГХ, и хроматограф больше не похож на аппендикс у масс-спектрометра. Большая чувствительность обнаружения и временные характеристики разрешают объединять МС устройства с капиллярной ГХ.

ГХВП-МС комбинация (ГХ высокого разрешения) в сочетании с разными методами ионизации и установления структуры посредством обработки данных является в настоящее время самым эффективным методом анализа в смысле границ обнаружения, а также количественной и качественной оценок.

Параллельно с квадрупольным детектором разрабатывалась ионная ловушка. В этом случае ионизация происходит непосредственно в селекторе масс, и здесь нет никакого отдельного источника ионизации, фокусирующей системы, обогрева, а также сопутствующей электроники, что делает этот детектор дешевле. Наряду с этим находят применение масс-спектрометры высокого разрешения с постоянным магнитом и высокочувствительные времяпролетные МС. С помощью двойных фокусирующих магнитных систем высокого разрешения в сочетании с капиллярной ГХ сегодня можно определять точные молекулярные веса летучих соединений и рассчитывать эмпирические формулы. Из-за развития более быстрых магнитов со временем сканирования от 0,2 с на массовую декаду исходное преимущество быстрого сканирования масс в квадрупольных приборах больше не является решающим.

Другой способ получения ионов представляет собой тепловое возбуждение в плазме. Наивысшей чувствительности определения достигают с помощью индуктивно-связанной плазмы (ИСП) как источника ионов для масс-спектрометрии. В факеле плазмы с помощью индуктивного подвода электрической энергии возникает аргоновая плазма с температурой более 6000 °С. Степень ионизации почти всех элементов составляет при этих высоких температурах более 90%. С аргоном как газом-носителем компоненты газа переносятся непосредственно в факел плазмы. Возникающие здесь ионы через охлаждаемый интерфейс переносятся в присоединенный квадрупольный масс-спектрометр, где определяются в соответствии с их зарядом и массой [3.49].

3.8.1.1. Квадрупольный масс-спектрометр

В квадрупольном масс-спектрометре, также называемом масс-селективным детектором, разделения масс происходит иначе, чем в масс-спектрометре с постоянным магнитным полем.

Между 4 магнитными стержнями поддерживается высокочастотное переменное электрическое поле. Если ионы попадают в поле, они вступают с ним во взаимодействие. Только ионы с определенным отношением масса/заряд перемещаются по стабильной траектории и достигают детектора. Варьируя электрическое поле, добиваются детектирования различных отношений масса/заряд (рис. 3.29).

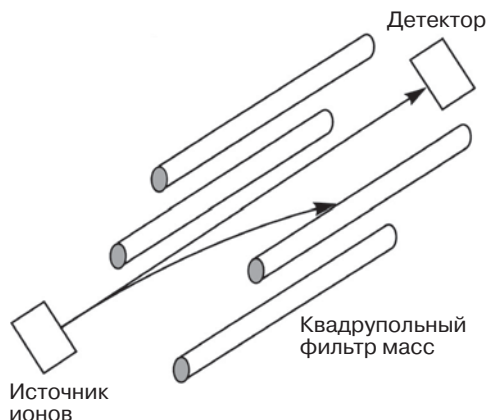


Рис. 3.29. Принцип квадрупольного масс-спектрометра

Между ГХ и МС существует принципиальная несовместимость, так как масс-спектрометр работает под вакуумом 10^{-6} бар, а газовый хроматограф – при 1 бар. Для преодоления этих трудностей был разработан ряд интерфейсов.

Квадрупольный масс-спектрометр состоит в основном из трех частей:

- источник ионов,
- масс-фильтр и
- детектор.

Для получения ионов в большинстве случаев используется ионизация электронным ударом, при которой нейтральные атомы и молекулы ионизируются бомбардировкой электронами с энергией 70 эВ. Источником самих электронов служит нагретая проволока (чаще всего из вольфрама или иридия, покрытого торием). При ионизации для каждого вещества и определенной энергии ионизации возникает типичный набор фрагментов («отпечаток пальцев»), который позже играет важную роль при идентификации компонентов анализируемой газовой смеси.

Образующиеся ионы ускоряются и попадают в систему из стержневых электродов, собственно фильтр масс, где они попадают под воздействие высокочастотного переменного напряжения и приложенного постоянного напряжения. Под действием высокочастотного напряжения ионы осуществляют колебательное движение, амплитуда которого растет с уменьшением массы, так что слишком легкие ионы покидают область масс-фильтра и не попадают в детектор. Тяжелые ионы, которые вряд ли последуют за высокочастотным напряжением, под действием постоянного напряжения медленно перемещаются к отрицательно заряженным квадрупольным электродам. Только ионы из узкой области масс, квази-окна, проходят фильтр масс и попадают в детектор. Принципиальное устройство квадрупольного масс-спектрометра представлено на рис. 3.30.

Детектор состоит из ловушки Фарадея (Faraday-Cup) и дополнительно (по желанию) подключаемого фотоэлектронного умножителя (ФЭУ). Независимо от формы умножителя он всегда должен быть установлен таким образом, чтобы ионы

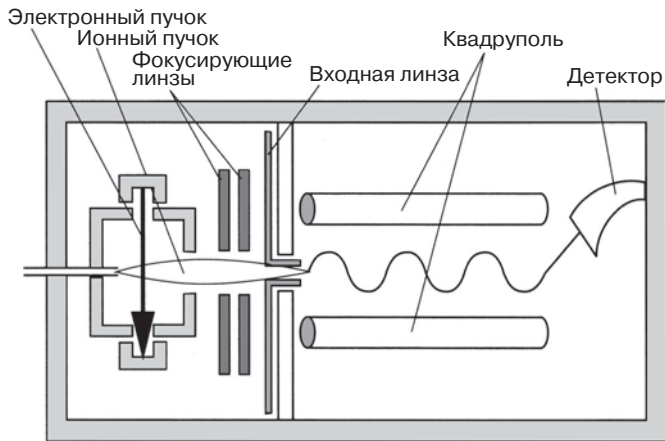


Рис. 3.30. Устройство квадрупольного масс-спектрометра

двигались по траектории, совершая поворот на 90° перед встречей с ФЭУ, так как только тогда можно предотвратить мешающий шум, причиной которого являются свет, электроны и нейтральные частицы. Ток ионов или величина вторичного электронного тока умножителя является тогда мерой парциального давления данного типа молекул внутри источника ионов. Этот очень маленький ток (примерно до 10^{-14} А) усиливается в предусилителе в высокочастотном блоке, оцифровывается затем в управляющем устройстве и выводится в виде показаний прибора.

Перенос вещества из ГХ в источник ионов масс-спектрометра происходит либо непосредственно, либо через интерфейс. При интерфейсе открытого типа, который сегодня предпочтительно применяется для ГХ-МС, отсутствует какое-либо закрытое соединение между концом капилляра и находящимся под высоким вакуумом источником ионов. Место соединения омывается гелием. Конец капиллярной колонки, таким образом, всегда находится при нормальном давлении, так что вакуум не влияет на эффективность хроматографического разделения и разрешения. Кроме того, при таком соединении существует возможность удалить растворитель до источника ионов и можно легко поменять хроматографическую колонку при включенном масс-спектрометре [3.50].

3.8.1.2. Работа с ГХ-МС

Первый шаг в ГХ-МС анализе — это обычно сканирование всей области масс. Идентификация веществ происходит с помощью библиотеки спектров, занесенной в компьютер, который одновременно и управляет детектором. Изучение характеристических пиков и ионов молекул играет важную роль при идентификации соединений.

В качестве примера рис. 3.31 показывает полный масс-спектр метилового эфира бензойной кислоты.

Вторым шагом является количественный анализ, причем регистрируют отдельные ионы. В режиме наблюдения выбранных ионов (англ.: SIM = Selected

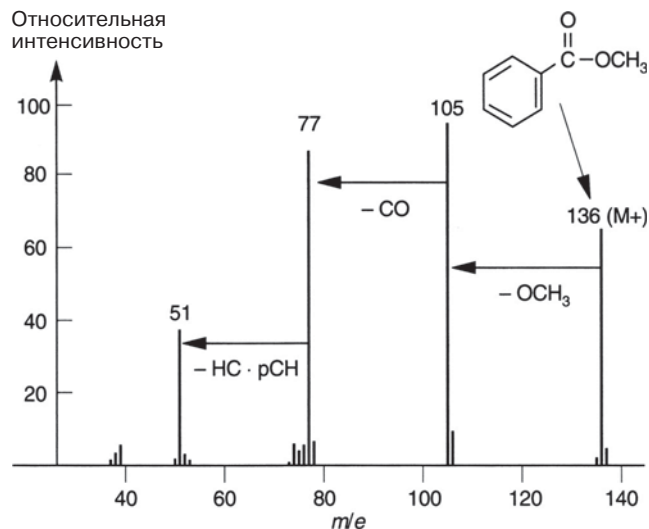


Рис. 3.31. Полный масс-спектр. В определенном диапазоне масс были измерены все отношения массы к заряду

Ion Monitoring) хроматограмма регистрируется только для определенных масс, характерных для ожидаемого соединения. При этом избирательно детектируются только определенные классы соединений, для которых характерно образование фрагментов с выбранной массой. Как показано на рис. 3.32, хроматограмма в зависимости от состава пробы содержит мало пиков, так как все другие вещества при этом не детектируются.

Главное преимущество этого целенаправленного анализа определенных соединений (в большинстве случаев, от 2 до 3) состоит в 1000 раз более высокой чувствительности по сравнению с режимом полного сканирования (SCAN).

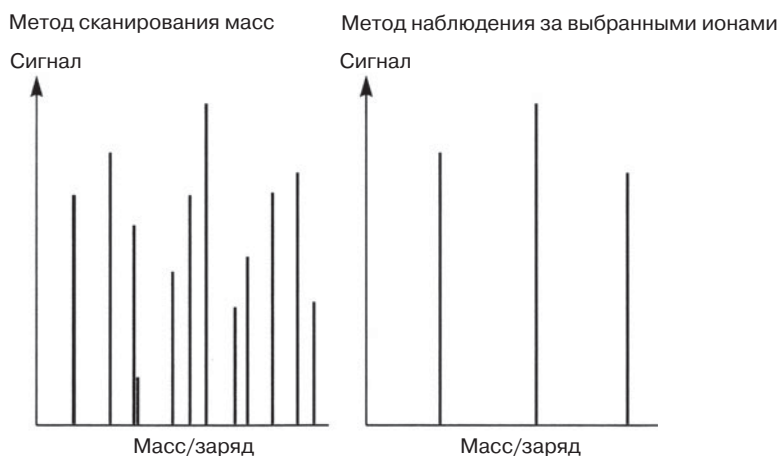


Рис. 3.32. Масс-спектр с полным сканированием SCAN (слева) и наблюдением за выбранными ионами SIM (справа)

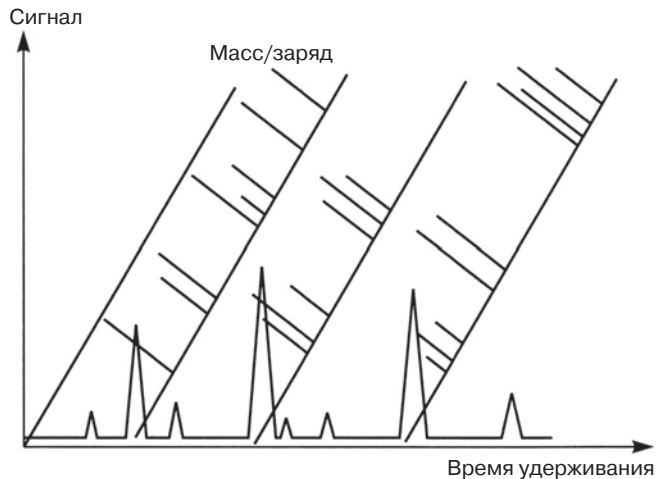


Рис. 3.33. Пример хроматограммы полного ионного тока

Так как в режиме регистрации отдельных ионов при данном отношении масса/заряд измерение может проводиться дольше, то чувствительность измерения при этом значительно повышается.

Если суммируют все единичные сканы и за все время анализа, то получают хроматограмму полного ионного тока (ПИТ, TIC), как это показано на рис. 3.33. Совершенствование метода ГХ-МС и стремительное развитие компьютерной техники привели к тому, что масс-спектрометрией теперь занимаются не только специалисты.

Масс-спектрометрия стала, таким образом, стандартным методом детектирования для газовой хроматографии. Компьютер управляет всей системой, записывает данные и сохраняет масс-спектры. Запоминание многих масс-спектров в секунду требует высокой производительности процессора и большого объема памяти. В рутинном анализе этот процесс полностью автоматизирован с помощью программного обеспечения. При использовании автодозатора до 100 проб могут обрабатываться по заданной программе от ввода пробы вплоть до выдачи результата.

Масс-спектрометр — это универсальный детектор. Если нужно проводить количественный анализ методом регистрации отдельных ионов, то сначала должны быть оптимизированы параметры хроматографического разделения. Затем нужно выбрать массу (молекулярный ион или фрагмент), характерную для исследуемого соединения. Сигнал должен быть достаточно интенсивным и не перекрываться с другими сигналами. Затем оптимизируются масс-спектрометрические параметры, каждая масса калибруется, и устанавливается время измерения для каждого иона, учитывая ширину пика и соотношения ионов.

Те же самые хроматографические требования должны выполняться при проведении качественных анализов. Имеющиеся в интернете базы данных МС спектров облегчают идентификацию. Масс-спектрометр нужно настроить так, чтобы напряжение, используемое ионной оптикой, обеспечивало максимальное поступление выбранных ионов в детектор. Для упрощения этого процесса современные

масс-селективные детекторы обладают автоматически регулируемой настройкой, то есть они автоматически оптимизируют параметры.

3.8.1.3. Химическая ионизация

Хотя спектр, получаемый при ионизации электронным ударом (ЭУ), является важным для библиотечного поиска спектром «отпечатков пальцев» даже в области следовых количеств, он нередко оказывается бесполезным при идентификации продуктов превращений, метаболитов или новых веществ, которые еще не зарегистрированы в коммерческих каталогах спектров. Самая ценная и максимально специфическая информация о соединении – сведения о его молекулярной массе – часто отсутствует в спектре ЭУ; таким образом, это – повод для сомнения, не является ли данная интерпретация неправильной.

В то время как ионизация электронным ударом (ЭУ) ведет к полной фрагментации структуры молекулы, более мягкая химическая ионизация (ХИ) позволяет получить сведения о молекуле в целом. Нежелательная фрагментация часто в значительной степени подавляется при косвенной ионизации реакционным газом (например, метаном, изо-бутаном или аммиаком). Доминирующие при этом процессы – это присоединение протона или других катионов из реакционной газовой плазмы.



Для проведения химической ионизации реакционный газ подается в источник ионов. Сегодня источники ионов большинства масс-спектрометров специально построены таким образом, что допускают простое изменение режима ЭУ на режим ХИ.

В первичной реакции необходимые реакционные ионы $R-H^+$ (например, из NH_3 , NH_4^+) получаются в ходе ионизации реакционного газа R . Только во вторичной реакции ионы кластера реакционного газа реагируют с молекулами вещества, элюируемого из колонки в анализатор, например, путем протонирования M с образованием $M-H^+$. Тем самым получают ион молекулярная масса + 1, что связано с присоединением протона. Как пример на рис. 3.34 показаны спектры ЭУ и ХИ малатиона, средства защиты растений, с молекулярной массой 330. В спектре ЭУ молекулярный пик полностью отсутствует из-за сильной фрагментации, в то время как в спектре ХИ присутствует масса 331 ($330 + 1$).

3.8.1.4. Метод изотопного разбавления в МС-ГХ

Техника разбавления изотопов представляет для многих веществ высокочувствительный и высокоспецифичный метод определения, в котором потери, неизбежные во время подготовки пробы, в целом компенсируются.

В этом методе определяемое вещество, содержащее стабильный изотоп, добавляют к пробе в качестве внутреннего стандарта. Вещества с различными изотопами едва ли отличаются по своим химическим и физическим свойствам и хроматографируются в идентичных условиях. Однако, поскольку они обладают раз-

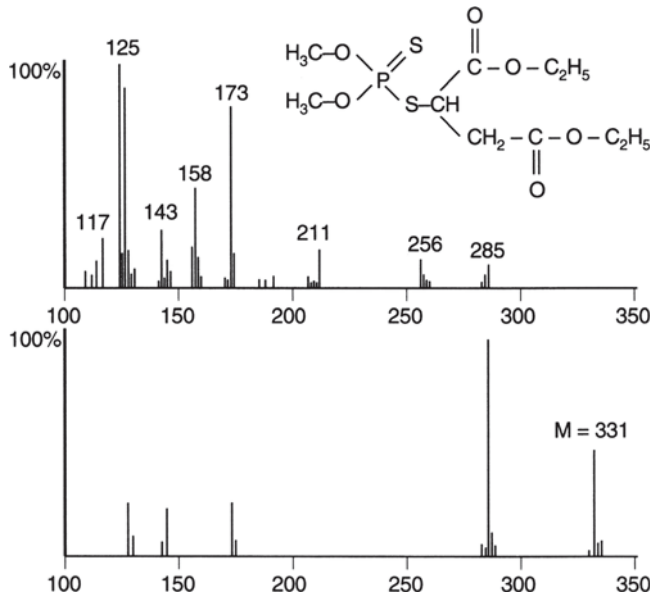


Рис. 3.34. ЭУ- и ХИ-спектры малатиона

ными молекулярными массами, они могут отдельно детектироваться с помощью масс-спектрометрии.

Так как вещество, меченное стабильным изотопом, добавляется к пробе в определенном количестве, то его потери будут такими же, как и вещества, присутствующего в пробе. Для количественного анализа тогда рассчитывают отношение МС сигнала немеченого соединения к сигналу меченого. Возникшие при подготовке пробы потери будут, таким образом, скомпенсированы [3.51]. Тем не менее, качественная пробоподготовка является, естественно, предпосылкой для получения хорошего результата анализов.

3.8.1.5. Техника ГХ-МС/МС

МС/МС, давно известная как специальная техника масс-спектрометрии, осваивается в последнее время также для ГХ [3.52]. В МС/МС сначала получают обычный масс-спектр, т.е. как обычно поток ГХ-элюата ионизируется с помощью ЭУ- или ХИ-ионизации. Этот масс-спектр непосредственно не регистрируют, а выбирают из этого масс-спектра массу, которую называют материнской массой, целевым ионом или, в большинстве случаев, обозначают сегодня в англоязычной литературе как ион-предшественник (Precursorion). Этот ион-предшественник затем ионизируется еще раз на второй ступени ионизации. Получаемый при этом масс-спектр детектируют и обрабатывают, он представляет собой масс-спектр продуктов распада иона-предшественника, его также называют масс-спектром дочерних ионов [3.53].

МС/МС дает, таким образом, масс-спектры отдельных ионов. Можно получить и обработать масс-спектры продуктов распада каждого из ионов-предшественников. Спектры отдельных ионов из «обычных» масс-спектров могут быть полезны-

ми с различных точек зрения. При выяснении путей фрагментации и при определении структуры МС/МС дает бесценную и часто иначе не доступную информацию. Этот метод позволяет улучшить отношение сигнал-шум, особенно при анализе следовых количеств. С помощью уменьшения химического шума, путем вычитания фона сложных матриц, удается достичь более низких пределов детектирования.

В особенности при идентификации и количественном анализе проб, которые осложнены наличием большого фона, МС/МС дает возможность однозначно распознавать, идентифицировать и количественно определять находящиеся в них вещества [3.54]. Даже вещества, которые перекрываются компонентами матрицы, можно количественно определить однозначно и чрезвычайно точно. Преимуществами ГХ-МС/МС, таким образом, являются:

- однозначная идентификация (независимо от матрицы) и
- однозначный количественный анализ (независимо от матрицы).

МС/МС анализ проводится в магнитных секторных масс-спектрометрах и квадрупольных ионных ловушках. Так как анализы МС/МС могут выполняться с обычной ионной ловушкой с внешней ионизацией, то на рынке предлагаются дешевые настольные устройства для анализа ГХ-МС/МС. Квадрупольная техника обладает сравнимыми возможностями, но имеет то преимущество, что позволяет снимать спектры в более широком диапазоне масс.

Для квадрупольной техники необходимо как минимум три квадруполя. В таком анализаторе с тройным квадруполем первый квадруполь твердо ориентирован на массу иона-предшественника. Средний квадруполь устроен как камера соударений, где фрагментация иона-предшественника индуцируется столкновением с реакционным газом; он не работает как масс-спектрометр. В третьем квадруполе дочерние ионы регистрируются в виде обычного масс-спектра. Эти пространственно разделенные процессы происходят за миллисекунды, так что всегда достигается достаточное хроматографическое разрешение.

Наряду с регистрацией дочернего спектра конструкция тройного квадруполя предоставляет возможность записи также спектров ионов-предшественников и спектров нейтральных остатков. При сканировании ионов-предшественников на определенную массу настраивается только первый квадруполь, в то время как третий квадруполь установлен на определенный дочерний фрагмент. При сканировании спектра нейтральных остатков оба квадруполя настраиваются одновременно с определенной разницей масс. Таким образом, детектируются нейтральные фрагменты с этой постоянной разницей масс для разных ионов-предшественников. Это дает отличную возможность проводить скрининги определенных классов веществ. Так, например, отщепление СОСІ фрагмента указывает на диоксины [3.55].

Техника ГХ-МС/МС универсальна и предлагает значительно лучшие аналитические возможности, чем одноступенчатая МС-ГХ. Она служит для расшифровки структуры и дает большую надежность в следовом анализе. Детектирование отдельных дочерних ионов позволяет высокоселективное обнаружение и количественное определение заранее выбранных соединений. При этом МС/МС техника может комбинироваться со всеми видами ионизации, такими как химическая ионизация.

3.8.2. ГХ-ИК-Фурье

Долгое время инфракрасная спектроскопия была одним из излюбленных аналитических методов. ИК спектроскопия очень популярна также и в комбинации с газовой хроматографией. Инфракрасная спектроскопия с Фурье преобразованием (ИК-Фурье) является усовершенствованием ИК спектроскопии и дает решающие преимущества: получение необходимой скорости и чувствительности для доказательства элюированных соединений [3.56]. Только при внедрении метода преобразования Фурье удалось соединить капиллярную ГХ высокого разрешения с инфракрасной спектроскопией.

Принцип инфракрасной спектроскопии основывается на том факте, что атомы в составе молекулы вибрируют с определенными характеристическими частотами, которые характерны для межатомных связей в молекуле. Эти частоты лежат в инфракрасной области электромагнитного спектра. Если облучают пробу инфракрасным светом, то она поглощает характерные частоты. При этом возникающий набор частот с определенной интенсивностью известен как инфракрасный спектр поглощения, характерен для каждого вещества и может служить для его идентификации. Инфракрасный спектр соединения дает сведения о классе соединения, а также о типе и положении функциональных групп или заместителей и может использоваться как отпечаток пальцев для однозначной идентификации многих известных соединений.

Задачей соединения газовой хроматографии и ИК спектроскопии является спектроскопическая идентификация разделенных компонентов по инфракрасным спектрам. Подобно комбинации ГХ-МС соединение хроматографа с ИК-Фурье спектрометром создало метод, который нельзя охватить обычным понятием «ГХ детектор». Фурье ИК-спектроскопия разрабатывалась не для того, чтобы следить за разделением веществ, а как ценный качественный аналитический метод, с собственной приборной базой и характерной для него историей развития, полностью независимой от ГХ. С точки зрения этих больших устройств, хроматограф является системой ввода пробы с возможностью ее очистки.

Основой ИК-Фурье спектрометра является интерферометр Михельсона. На рис. 3.35 показано, какой путь проходит излучение ИК источника в интерферометре. Все излучение попадает на полупрозрачное зеркало. От него часть излучения отражается на подвижное зеркало, а другая половина проходит сквозь него на неподвижное зеркало. Отраженный свет обоих зеркал затем снова встречается на дифракционной решетке. Лучи, которые приходят от обоих зеркал, обнаруживают различие фаз, если расстояние от подвижного зеркала до решетки отличается от расстояния между неподвижным зеркалом и решеткой. В зависимости от расстояния, на котором находится подвижное зеркало, комбинируемые излучения находятся либо в фазе, либо нет. Из-за этого возникает интерференция. После того как свет покинул интерферометр, он направляется в измерительную ячейку, где поглощается соединениями, которые выходят из хроматографической колонки хроматографа.

Для этой гибридной техники несомненно необходим ИК-Фурье спектрометр с высокой интенсивностью излучения и высокой стабильностью фона. В зависимости от производителя при записи спектров применяются два разных метода.

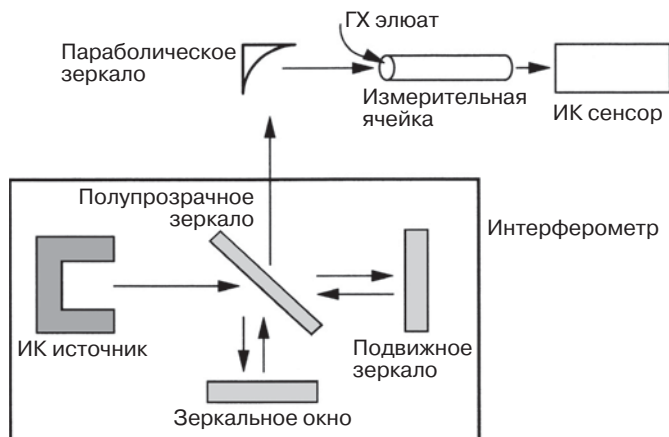


Рис. 3.35. Схема ИК-Фурье детектора

СВЕТОВОДНАЯ ТЕХНИКА

Элюированные из колонки компоненты направляются через нагреваемую, покрытую золотом трубочку, через которую проходит также инфракрасное излучение. Для предотвращения эффектов конденсации подводы газовых хроматографов также должны нагреваться наряду с ИК кюветами. В зависимости от решаемых задач кюветы доступны с разными толщинами золотого покрытия и различными внутренними диаметрами. Для рутинной работы применяются кюветы длиной от 20 до 60 см с общим объемом от 2 до 5 мл [3.57]. В этом методе с использованием капиллярных кювет (световодов) хроматографическое разрешение отчасти ухудшается из-за большого измерительного объема ячеек. Так как отдельные вещества детектируются непосредственно в процессе хроматографии, этот вид ИК детекции назвали «на лету» (англ.: «On-the-fly»).

Прямое детектирование вещества в капиллярной кювете требует, в частности, для капиллярных колонок с их короткими временными промежутками между пиками, очень быстрой записи спектров, чтобы гарантировать соответствующее число спектров в течение одной секунды. В противоположность обычной ИК спектроскопии, спектры записываются в газовой фазе, которые в сравнении со спектрами твердых образцов претерпевают смещение волновых чисел во многих областях спектра. Кроме того, ИК спектры в газовой фазе не показывают, в общем случае, такую тонкую структуру, как спектры, полученные для конденсированной фазы. В газовой фазе существует значительно меньше водородных связей. Таким образом, в итоге, например, колебания гидроксильных и аминогрупп, а также атомов водорода дают в ИК спектре четкие и интенсивные полосы поглощения. Это затрудняет поиск спектров в обычных ИК библиотеках; лучше библиотеку спектров привести в соответствие со спектрами в газовой фазе.

МЕТОД ВЫМОРАЖИВАНИЯ

В этом методе компоненты, выходящие из колонки, замораживаются на пластинке, охлаждаемой жидким азотом. После хроматографического разделения про-

исходит, собственно, запись ИК спектров на поверхности пластины. При достаточно длительном времени измерения достигают очень хорошего отношения сигнал/шум даже для самых маленьких концентраций. За счет удаления матрицы граница определения может быть увеличена на несколько порядков по сравнению с методом капиллярных кювет (световодов). Для идентификации сорбатов можно использовать обычные библиотеки спектров, кроме того замороженные составные части пробы можно выделить и исследовать другими методами. Однако метод с удалением матрицы требует более дорогого оборудования.

Недостаток ручного сбора проб был устранен, когда был разработан автоматический коллектор фракций. Элюат из колонки направляется на покрытое золотом вращающееся стекло, которое охлаждается жидким гелием. В элюат подается ток аргона, и компоненты замораживаются в твердой матрице аргона на стеклекolleкторе. С помощью шагового электродвигателя зоны компонентов наносятся на вращающееся стекло в форме спирали. На глубокой замороженной хроматограмме отдельные зоны веществ располагаются в соответствии с их временами удерживания, и для них измеряют спектры отражения. В твердой матрице аргона спектры могут измеряться сколько угодно раз до тех пор, пока не будет получен качественный спектр, достаточный для идентификации компонента. В результате удается достичь очень низких пределов обнаружения вплоть до пикограммовых количеств [3.58].

ИК-Фурье спектрометр, используемый в ГХ, состоит из собственно ИК-Фурье спектрометра, то есть источника модулированного инфракрасного излучения, интерфейса ГХ/ИК к кюветной системе и ИК детектора и управляющей электроники и системы обработки данных с библиотекой спектров. По сравнению с МС детекторами дисперсионные ИК спектрометры значительно менее чувствительны, и величина их сигнала зависит от концентрации пробы. Тем не менее, переход от дисперсионного ИК спектрометра к ИК-Фурье спектрометру ознаменовал улучшенную чувствительность, высокую скорость и спектральную точность. Высокие требования к механической стабильности, постоянству температуры и оптической точности отражаются на цене приборов. Однако аналитические возможности прибора, необходимого для ГХ, также очень высоки [3.59].

Техника ИК-Фурье сравнима по скорости с капиллярной ГХ при разрешении от 3 до 10 интерферограмм в секунду со спектральным разрешением 8 см^{-1} и чувствительностью от 5 до 20 нг для веществ, относительно хорошо поглощающих в ИК области. Используя толстопленочные капиллярные колонки и прямой ввод пробы, возможности прибора можно расширить и определять также слабопоглощающие вещества.

Записанные спектры обрабатываются разными способами. Наиболее информативный — это, естественно, поисковая процедура для идентификации отдельных пиков. Здесь требуется соответствующая высококачественная поисковая программа, а также надежная библиотека. Наглядное представление о протекании хроматографического процесса дают трехмерные графики. В области программного обеспечения для обработки данных, а также аппаратных средств для сохранения все больших объемов данных для онлайн-применения нужно ожидать дальнейшего прогресса. Время и скорость обработки все более плотных по-

токов информации и в хроматографии не в последнюю очередь определяют стоимость и, вместе с тем, соотношение цена/производительность этих современных методов.

3.8.2.1. Комбинация ГХ-ИК-Фурье и МС

Одновременное подключение МС и ИК-Фурье к ГХ дает максимум аналитической информации [3.60]. Однако собственно комбинация МС и ИК детекторов требует точного рассмотрения всех деталей, таких как скорость потока, температура и механика [3.61]. Для оптимальной работы МСД требуется вакуум примерно 4×10^{-5} бар, которого при существующей мощности молекулярного турбонасоса достигают при максимальной скорости потока 1 мл/мин. Как только скорость потока превосходит это значение и давление растет, качество спектров МС падает. Таким образом, нужно позаботиться о том, чтобы не допускать слишком высоких скоростей потока газа-носителя. С другой стороны, МСД в режиме сканирования примерно в 10 раз более чувствителен, чем ИКД. То есть, если приемлемый масс-спектр получают для 1 нг вещества, то для инфракрасного спектра необходимо 10 нг этого вещества при условии, что оно хорошо поглощает в ИК области. Для слабопоглощающих веществ необходимые количества еще выше. Поэтому очень важно, чтобы в ИКД с колонки поступало как можно больше пробы. Имеются три различных возможных конфигурации ГХ-ИКД-МСД [3.62].

Конфигурация с двумя колонками представлена на рис. 3.36; она использует две отдельные колонки, которые имеют разные размеры, поскольку разные детекторы требуют различных потоков подвижной фазы.

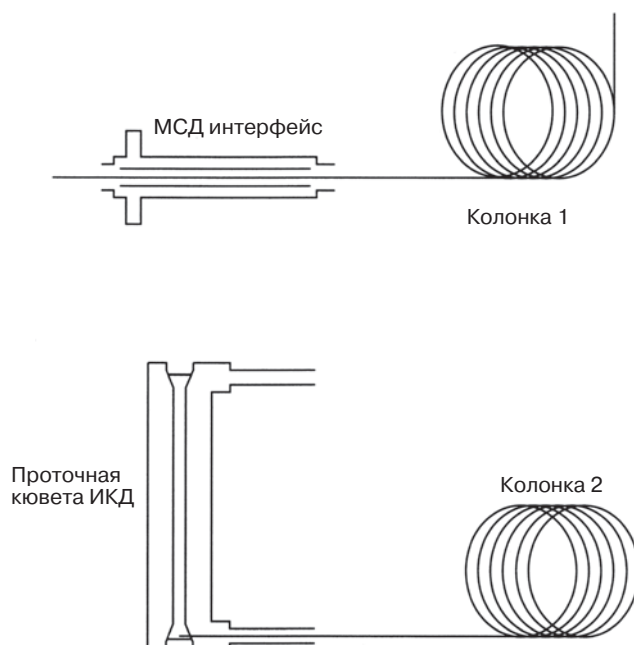


Рис. 3.36. Двойная ИКД-МСД конфигурация

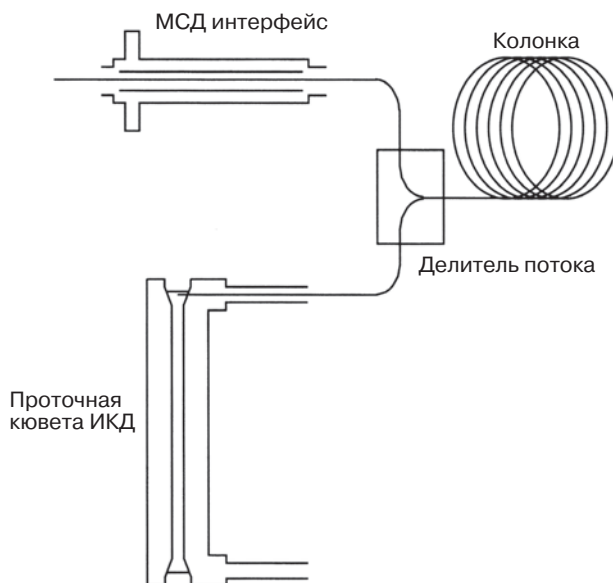


Рис. 3.37. Параллельная ИКД-МСД конфигурация

Обе колонки установлены в инжекторе; здесь проба разделяется, причем соотношение потоков определяется длиной и диаметром колонок. При этом большая часть пробы идет к менее чувствительному ИКД.

Двойную конфигурацию непросто отрегулировать, и только очень тщательным подбором различных длин колонок методом «проб и ошибок» достигают соответствия времен удерживания на обеих колонках.

Параллельная конфигурация ИКД-МСД использует одну колонку, установленную в инжекторе, и делитель потока в конце колонки, который направляет одну часть элюата в ИКД, а другую часть — в МСД. Как показано на рис. 3.37, разделенный поток вещества приходит, таким образом, одновременно в оба детектора, и поэтому соотношение отдельных спектров возможно непосредственно по временам удерживания. Соотношение потоков определяется пользователем и обычно лежит между 5 : 1 и 10 : 1 в пользу ИКД. Эта конфигурация может применяться также для комбинации с другими детекторами. Например, при анализе дистиллятов отработанного масла и допинг контроле оказалось пригодным многомерное детектирование по схеме, состоящей из трех параллельно соединенных детекторов и одной хроматографической колонки; причем данные об удерживании получают одновременно из ПИД, ДЭЗ и МСД [3.63].

Наилучшую технику комбинирования представляет последовательная конфигурация ИКД-МСД. Как показано на рис. 3.38, она использует одну колонку, установленную в инжекторе, и весь поток элюата с колонки проходит сначала через проточную кювету ИКД. Так как при ИК спектроскопии вещества не разрушаются, то затем они могут быть направлены в масс-спектрометр. В МСД попадает только часть пробы, в большинстве случаев меньше 20%. Остаток сбрасывается через Т-образный делитель потока. Таким образом, достигают наилучшего использования ИКД

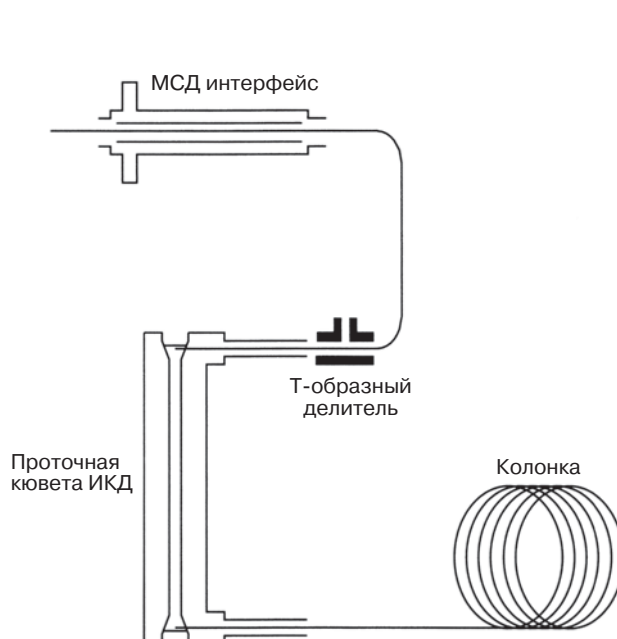


Рис. 3.38. Последовательная ИКД-МСД конфигурация

в смысле чувствительности и хроматографического разрешения. Последовательная конфигурация — самый простой и наименее проблемный универсальный метод с практически одинаковыми временами удержания на каждом из детекторов [3.64].

3.8.3. Атомно-эмиссионный детектор

Исследователи уже многие годы пытались соединить оптическую атомную эмиссионную спектроскопию (ОАЭС) с газовой хроматографией, чтобы идентифицировать отдельные элементы в колоночном элюате. Плазма, индуцированная микроволнами (ПИМ), используется в атомном эмиссионном детекторе (АЭД) как источник возбуждения. Если атомы переходят в возбужденное состояние, они испускают свет при определенных характеристических длинах волн. АЭД разрушает пробу и возбуждает атомы. Для этого необходима большая энергия, которая поставляется плазмой, индуцированной микроволнами. После того как атомы перешли в возбужденное состояние, они излучают свет при переходе на более низкий энергетический уровень. Излучаемые при этом различной длины волны измеряются с помощью спектрометра.

Для ионизации атома должна быть затрачена энергия ионизации. В качестве газа плазмы при этом особенно подходит гелий с его очень высокой энергией ионизации. С гелием все элементы периодической системы дают эмиссию в обычной области длин волн от 190 до 800 нм. Элементспецифически могут быть детектированы H, D, C, N, S, P, Si, галогены и т.д., граница обнаружения лежит в области нг. При такой чувствительности можно без проблем работать также и с капиллярной колонкой [3.65]. Аргон как газ для плазмы дешевле, но его энергии ионизации

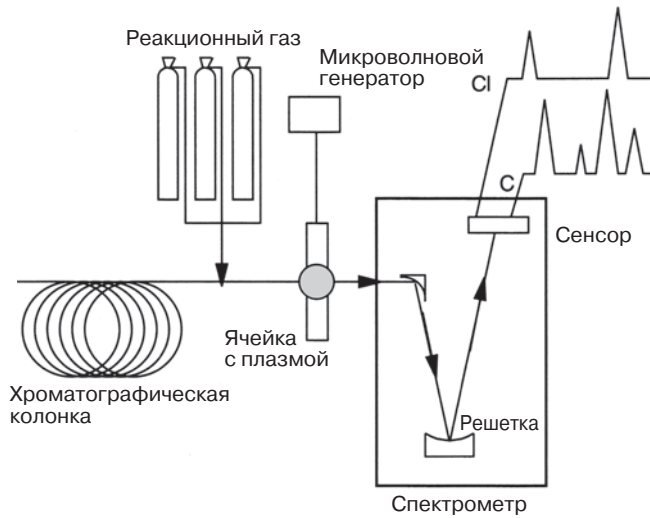


Рис. 3.39. Устройство атомно-эмиссионного детектора

ции не хватает, чтобы возбуждать полосы эмиссии многих неметаллов выше легкодоступной области длин волн до 190 нм.

Эмиссия возбуждается плазмой He, индуцированной микроволнами, с температурой газа более чем 4000 °С. В эту плазму подается элюат из колонки. Элюированные компоненты подвергаются пиролизу, и элементы возбуждаются, излучая элементспецифические полосы. Излучение попадает на монохроматор, если детектируется отдельный элемент, или полихроматор, снабженный микрокомпьютерной системой для детектирования нескольких элементов. Рис. 3.39 показывает схему устройства атомно-эмиссионного детектора (АЭД).

Атомно-эмиссионные детекторы нуждаются в микроволновом источнике, который похож на микроволновую печь, и спектрометре для измерения испускаемого света. В качестве носителя/газа для плазмы необходим высокоочищенный гелий (99,9999%), так как загрязнения могут ухудшать количественное определение.

Контаминации детекторной ячейки, которая состоит из керамической трубки, минимальны в условиях пиролиза, подобно тому как это имеет место у ПИД. Дополнительно подводится «промывной газ», который должен предотвращать отложения загрязнений на оптике; система, таким образом, самоочищается.

Систему просто калибровать, нужно только вещество для калибровки. В противоположность всем другим типам детекторов, при атомной эмиссии отсутствуют какие-либо специфические влияния на молекулярном уровне. Кроме того, этот детектор исключительно селективен. При этом одновременно могут измеряться несколько (максимум шесть) полос элементов. Для C, Cl, N и т.д. получаются элементспецифические хроматограммы. Вся система управляется и контролируется компьютером.

Наряду с очень чувствительной качественной информацией для многих элементов получают также количественные результаты, так что в благоприятном случае становится возможным установление даже брутто-формулы соединения.

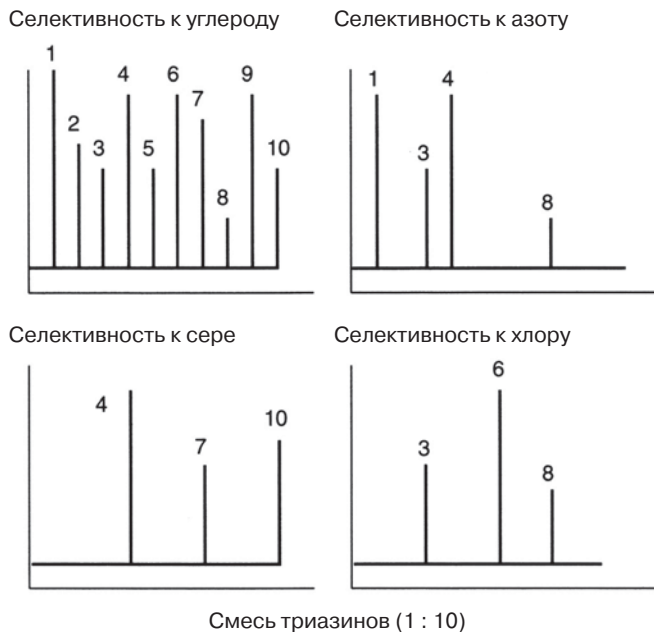


Рис. 3.40. Элементселективная хроматограмма следов С, N, S и Cl, полученная с помощью АЭД

Рис. 3.40 показывает многоэлементную избирательность АЭД. На этой хроматограмме получены сигналы углерода, азота, серы и хлора из единственного ГХ ввода пробы различных триазинов. Специфические для данного вещества элементы показаны в форме относительного числа атомов данного сорта в соединении.

3.8.4. Комбинация ЖХ-ГХ

Комбинация жидкостной хроматографии с газовой хроматографией служит для обогащения аналитов, удаления мешающей матрицы или для разделения на группы веществ, чтобы после этого, работая с чистыми фракциями, уменьшить шум детектора и, вместе с тем, улучшить пределы обнаружения газохроматографического анализа. ВЭЖХ тем самым играет роль автоматизированной системы пробоподготовки для ГХ. Для этих целей используется почти исключительно ВЭЖХ с нормальными фазами и органическими элюентами, так как обращенные фазы используют водные элюенты. Ввод воды в газовый хроматограф в высшей степени проблематичен, так как вода обладает высокой температурой кипения и очень высокой энтальпией испарения.

Кроме того, нужно учитывать разные скорости потока между ВЭЖХ и ГХ. В стандартной ВЭЖХ при групповых разделениях объемы фракций лежат в области миллилитров, в то время как в ГХ на колонку можно вводить только несколько микролитров. С этой точки зрения преимуществом обладают микроколоночная или капиллярная ЖХ, работающие с малыми скоростями потока. Дополнительно в ГХ можно использовать ввод пробы с делением потока. При вводе без деления потока

поступающий элюат из ВЭЖХ колонки через интерфейс подается на предколонку, находящуюся при низкой температуре. При повышении температуры термостата растворитель, адсорбированный на стенке капилляра, испаряется в поток газа-носителя. Другой метод, который подходит также для очень больших количеств пробы, представляет собой интерфейс типа петля. При этом часть элюента выделяется из общего потока в петле для ввода пробы и переносится затем в поток газа-носителя [3.66].

3.9. Какой детектор нужно применять для какой пробы?

Из представленных здесь детекторов можно сознательно выбирать теперь подходящий детектор для соответствующей пробы. В новой аналитической задаче возникают вопросы, на которые отдельные принципы детектирования могут отвечать по-разному. В табл. 3.6 указаны некоторые типичные требования к анализу и подходящие для этого методы детектирования. Например, ПИД может детектировать все органические соединения, однако их идентификация возможна только по времени удерживания. С масс-селективным детектором в принципе можно идентифицировать все соединения из этой таблицы.

Таблица 3.6. Выбор ГХ детекторов для различных классов соединений

Назначение	Подходящий детектор
Структурная информация о пробе	МСД или ИКД
Анализ следов	ДЭЗ, АФД, МСД (в опции выделенного иона)
Высокая селективность (сложная матрица)	АФД, ДЭЗ, МСД, ДЭП, ПИД
Перманентные газы	ПИД, ДИГ
Углеводороды	ПИД, ФИД
Галогенсодержащие соединения	ДЭЗ, ДЭП
Азотсодержащие соединения	АФД, ДЭП
Серасодержащие соединения	ПИД, ДЭП
Фосфорсодержащие соединения	ПИД, АФД
Кислородсодержащие соединения	ИКД
Изомеры	ИКД

3.10. Выбор газа-носителя

В противоположность ЖХ мобильная фаза в газовой хроматографии служит только для транспорта вещества через колонку, она не взаимодействует со стационарной фазой. Выбор газа-носителя определяется выбором детектора, видом определяемых компонентов, а также требуемым временем удерживания. Газ-носитель играет особенно важную роль для эффективности разделения и предела обнаружения при анализе газов.

Влияние газа-носителя на эффективность разделения описывается уравнением Ван-Деемтера (Ван Деемтер, Зюдервег и Клингенберг, 1956). Наполненные колонки оснащаются регулятором потока, который обеспечивает постоянный, не-

зависящий от сопротивления колонки поток газа. Оптимизация происходит через определение объемной скорости потока (> 20 мл/мин) в конце колонки.

Применение капиллярных колонок требует регулятора давления, который обеспечивает независимое от вязкости газа и постоянное давление в колонке. В противоположность наполненным колонкам оптимизация эффективности разделения осуществляется определением линейной скорости потока газа. Скорость потока – самый важный параметр для достижения оптимального хроматографического разрешения.

Так как с капиллярными колонками работают почти всегда с программированием температуры, то вязкость газа и, следовательно, линейная скорость потока газа u меняются в зависимости от температуры. Поэтому определяют так называемую среднюю линейную скорость потока газа. Чтобы определить эту величину, через инжектор и колонку пропускают неударжаемое соединение, например, метан для ПИД, дихлорметан для ДЭС или воздух для МС системы, и тем самым определяют мертвое время системы t_0 .

Из измеренного мертвого времени рассчитывается линейная скорость потока газа u , равная отношению длины колонки l в сантиметрах ко времени выхода мертвого объема.

$$u = l/t_0.$$

Диаграмма Ван-Деемтера на рис. 3.41, которая дает зависимость ВЭТТ как обратной величины эффективности колонки от средней линейной скорости газа-носителя u , показывает оптимальную скорость для гелия 21 см/с. Эта величина не зависит от диаметра колонки. Для водорода ее значение составляет 38 см/с, а для

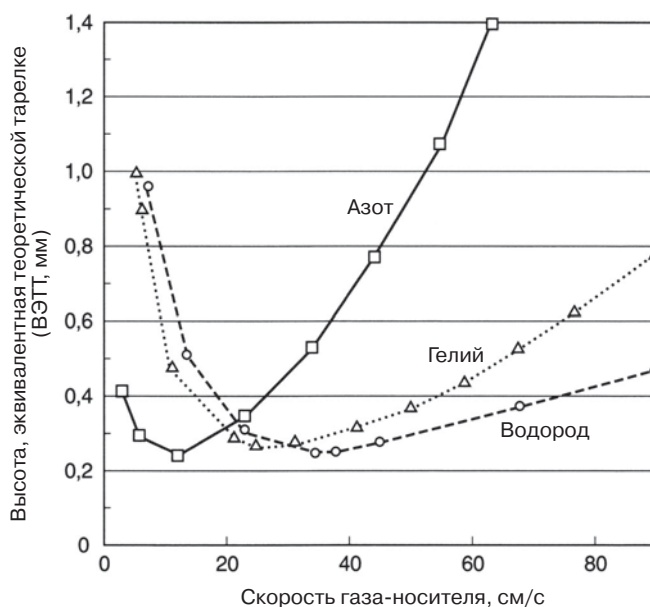


Рис. 3.41. Диаграмма Ван-Деемтера для трех газов-носителей

азота – 12 см/с. Минимум на каждой кривой для соответствующего газа-носителя точно соответствует точке, где колонка работает с наибольшей эффективностью.

Если рассмотреть форму кривых, то обращает на себя внимание сильное падение эффективности разделения при уменьшении линейной скорости ниже оптимальной величины. Причина этого – сильный рост диффузии, который особенно сильно проявляется в газах с их высокими коэффициентами диффузии. Напротив, эффективность колонок остается высокой, если линейная скорость лежит выше оптимума. Здесь эффективность разделения понижается из-за снижения массообмена со стационарной фазой.

На основе диаграммы Ван Деемтера и вышеизложенной теории можно сделать несколько заключений практического характера, рассматривая которые можно существенно повысить хроматографическую эффективность колонки.

- С ростом молекулярной массы газа-носителя повышается эффективность разделения, с понижением молекулярной массы увеличивается скорость потока газа, соответствующая максимальной разделяющей способности колонки, что ведет к сокращению времени анализа.
- Для достижения максимальной эффективности разделения колонка должна работать в области оптимальной скорости потока газа. Тем не менее, на практике рекомендуется работать с несколько более высокими, чем оптимальные, потоками. При этом число тарелок снижается незначительно, но зато отчетливо уменьшается время анализа. Кроме того, нужно думать о том, что при программировании температуры вязкость газа увеличивается с ростом температуры и, таким образом, скорость потока уменьшается.
- Как правило, детектор определяет выбор газа-носителя. В зависимости от поставленной задачи нужно выбирать между более тяжелым газом для более высокой эффективности и более легким для более быстрых анализов.
- Разрешение можно увеличить понижением температуры колонки. Предел этому устанавливает, все же, увеличение времени анализа, однако, одновременно, уменьшается опасность разложения пробы. При слишком низких температурах все же часто проявляются эффекты адсорбции.
- С уменьшением диаметра колонок эффективность разделения очевидно растет. В той же мере падает, однако, допустимая нагрузка колонок.

Газы-носители поставляются обычно в баллонах под давлением. Чистота используемого газа определяется используемыми детекторами. Поставщики газа предлагают для каждого газа соответствующую чистоту, которая характеризуется цифровым кодом. Код состоит из числа перед и после запятой: до запятой пишут общее число девяток, а затем цифру, занимающую последнее место после запятой. Несколько примеров этого кода чисел указаны в табл. 3.7.

Таблица 3.7. Коды чисел для характеристики чистоты газов

Гелий 2,0	99 об. %
Гелий 3,0	99,9 об. %
Гелий 3,6	99,96 об. %
Гелий 5,0	99,999 об. %
Гелий 5,5	99,9995 об. %

Наряду с этими общими замечаниями нужно обращать внимание на особые рекомендации по выбору газа-носителя для каждого детектора.

- **Детектор теплопроводности**

Различие проводимости тепла газа-носителя и компонентов пробы имеет решающее значение для величины отклика (Response) и чувствительности. Водород и гелий имеют наибольшую теплопроводность и дают, таким образом, самую большую чувствительность для этого детектора. По соображениям безопасности и из-за относительно редкого содержания в газовых пробах гелий – это чаще всего используемый газ-носитель в сочетании с ДТП.

- **Пламенно-ионизационный детектор**

Так как ПИД не реагирует на перманентные газы, выбор газа-носителя не имеет большого значения. Газ с меньшей теплопроводностью в результате более высокой температуры пламени в целом повышает чувствительность.

- **Детектор электронного захвата**

Для работы ДЭЗ может использоваться либо азот, либо аргон с 5 до 10% метана. Тем не менее, азот является подходящей и менее дорогой альтернативой.

- **Детектор ионизации гелия**

Для безупречной работы должен применяться ультрачистый гелий. Следует избегать возможных загрязнений газа-носителя вследствие негерметичности или диффузии.

3.10.1. Дополнения по очистке газа-носителя

В зависимости от вида и чистоты используемого газа-носителя содержащиеся в нем примеси могут вызвать помехи в проведении анализов или работе детекторов. В дополнении к этому, например, следы кислорода в газе-носителе вызывают окисление и разрушение стационарных фаз.

При сравнении цен для газов с разными степенями чистоты можно обнаружить довольно большие различия. Поэтому следует задуматься о том, не будет ли более выгодным использование газа более низкой чистоты в сочетании со специальными системами очистки. Область их применения – это, с одной стороны, анализы следовых количеств, требующие ультрачистых газов-носителей. С другой стороны, это серийный анализ на производстве, когда мешающие компоненты, которые нельзя обнаружить, могут частично избирательно удерживаться на колонке.

Производители систем очистки газов предлагают широкий выбор различных конструкций и мощностей для удаления отдельных веществ, например:

- **Кислород**

- высокий уровень шума в ДЭЗ, окисление стационарной фазы,
- пиролиз при исключении следов кислорода;

- **Вода**

- помехи в ДЭЗ и ионизационном гелиевом детекторе,
- изменение характеристики хроматографической колонки, например, колонки с молекулярными ситами;

- **Двуокись углерода или углеводороды**
 - удаление из потоков рабочего газа,
 - помехи при определенных разделениях или детекторах.

Более того, существуют различные комбинированные фильтры или конструкции, составленные из отдельных фильтров, которые могут настраиваться на каждый газ или под каждую аналитическую задачу.

3.11. Многомерная ГХ

Техника переключения хроматографических колонок была предложена вскоре после создания ГХ для решения проблем разделения, если, например, разделяющая способность отдельной колонки была слишком мала. Для этого проба распределяется с помощью переключающего устройства между различными колонками. Наряду с этим были разработаны различные дополнительные способы изменения направления потока газа для сокращения времени анализа и вымывания нежелательных компонентов пробы. Многомерная хроматография использует применение серий колонок с разной селективностью или емкостью, которые применяются в сочетании с техникой переключения колонок и использовании нескольких газовых хроматографов с разными рабочими температурами. При технике вырезания пиков, например, короткие отрезки элюата из первой колонки переносятся на вторую хроматографическую колонку, где происходит прекрасное разделение, к примеру, хиральных компонентов, углеводов минерального масла или средств защиты растений [3.67].

Простая на первый взгляд задача газохроматографического разделения инертных газов и низших углеводов, для которого необходимы адсорбционные и распределительные колонки, является известным примером разделений с переключением колонок. Чтобы получить окончательный результат при одном вводе пробы, фирма-производитель Perkin Elmer уже в начале шестидесятых годов создала устройство с тремя колонками и переключающими кранами. Примерно в то же время фирма Siemens предложила «прецизионный хроматограф» с пятью колонками.

Тогда основной областью применения был производственный анализ. Причиной тому были в то время инструментальные ограничения, так как устройства могли работать только в изотермическом режиме. В то же время исследуемые производственные потоки содержат большей частью компоненты с широким диапазоном температур кипения. Высококипящие компоненты могли в этом случае анализироваться только с помощью обратной промывки или сокращения длины колонок.

Переключение колонок хорошо известно и в лабораторных исследованиях. С внедрением капиллярных колонок, программирования температуры и селективных детекторов использование переключения колонок сначала несколько замедлилось. Однако с дальнейшим распространением ГХ и появлением новых задач, таких как анализ природных соединений или анализ окружающей среды, переключение колонок вновь приобрело значение. Поскольку системы детектирования



становятся все более чувствительными, то быстро растет и число определяемых компонентов, так что даже капиллярные колонки высокого разрешения быстро достигают предела своей разделяющей способности [3.68]. Многомерная газовая хроматография делает возможным значительное повышение эффективности хроматографических систем, чего нельзя обычно добиться с одной колонкой [3.69]. Поэтому переключение колонок снова интенсивно применяется сегодня, так как оно предлагает универсальное вспомогательное средство, расширяющее возможности хроматографического анализа [3.70].

В дополнение к переключению колонок часто имеет смысл анализировать одну и ту же пробу одновременно при различных температурах. Таким образом, можно точно настраивать температуру анализа как на проблему разделения, так и на оптимальные условия работы отдельных колонок. Применение различных колонок при разных температурах в системе с двухкамерной печью — часто используемый метод [3.71].

Принципиально возможно несколько колонок соединять узлами переключения таким образом, что для каждой области хроматограммы желаемая селективность будет достигнута выбором соответствующей колонки. При этом многомерная газовая хроматография может от очень простых систем из двух колонок доходить до высококомплексных систем [3.72]. Наиболее часто используемые схемы переключения хроматографических колонок:

- **обратная продувка** — для сокращения времени анализа и для обеспечения гарантированного удаления из колонки всех компонентов применяется обратная продувка колонки;
- **вырезание пиков** — для лучшего разделения неразделенной группы пиков или разделения следовых компонентов, которые сидят на «хвосте» другого компонента, присутствующего в большой концентрации, часть элюата вырезается и переносится на другую колонку.

Обратная промывка обеспечивает надежное завершение анализа, если обратная промывка предколонки проводится также долго, как она проводилась при проведении анализа в прямом направлении. При этом все высококипящие компоненты не будут больше элюироваться в основную колонку. Разделительная система однозначно очищается, и время анализа может быть сильно сокращено. При этом высококипящие компоненты не анализируются и не детектируются.

При количественном определении следовых компонентов существует опасность перекрывания пиков компонентов с компонентом, присутствующим в высокой концентрации. Следовые компоненты, находящиеся на «хвосте» основного компонента, могут плохо определяться количественно. Техника вырезания пика дает при этом возможность вырезать зону не полностью разделенных компонентов вместе с находящимся в ней основным компонентом и без каких-либо проблем достигнуть их разделения на второй колонке. Основная колонка при этом больше не перегружена, и ее разделяющая способность используется полностью. Для многокомпонентных смесей с широким диапазоном температур техника вы-

резания пика предлагает возможность производить предварительное разделение, например, на неполярной колонке: из хроматограммы вырезается часть пика и переносится на вторую, например, полярную, колонку.

Для того чтобы можно было использовать эти методы, необходимо, для наблюдения за результатом разделения на первой колонке и определения времени переключения колонок, поместить детектор между двумя колонками на Т-образном переходнике. Для эффективного переключения колонок переходники и краны не должны иметь мертвого объема. Согласно аналитическим требованиям и дальнейшему развитию технических возможностей улучшалась и техника переключения колонок. Прорывом явилось развитие техники переключения без кранов, предложенной Динсом (Deans) [3.73], которая была описана еще в 1967 г., и без всяких изменений с 1984 г. в улучшенной форме коммерчески доступна под названием UNIVAP. В этом методе, который свободен от мертвых объемов, компоненты пробы распределяются по колонкам не с помощью кранов, а наложением на переходник соответствующим образом направленного перепада давлений [3.74]. Технически название «бескрановый» ошибочно, так как для управления потоками газа для создания перепада давлений также применяются краны.

Дальнейшее после Динса улучшение бескранового метода было предложено в 1976 г. Мюллером в форме так называемого естественного переключения. Оно основывается на применении запатентованных переходников для колонок.

Принципиально к системе переключения предъявляются следующие требования:

- высокая плотность,
- высокая скорость переключения,
- возможность термостатирования,
- применяемость при высоких температурах,
- возможно меньший мертвый объем,
- химически и хроматографически инертное поведение,
- незначительная тепловая масса.

К сожалению, ни одна из систем не выполняет все требования. Основные области применения переключающих кранов в системе переключения колонок:

- выбор колонки,
- обратная промывка,
- отсоединение колонки,
- многофункциональность упомянутых выше приложений.

Большинство переключений колонок разработано специально для конкретных проблем и поставленных задач. При этом они, тем не менее, должны быть такими гибкими, чтобы их можно было применять также при возможных отклонениях во времена удерживания или больших изменениях концентраций. В этом случае говорят о надежности системы переключения, которая является одной из ее характеристик. Для решения специфических задач разделения обязательным является ведение рабочего журнала. Там точно должны описываться проблема и ее особенности. К ним принадлежат:

- описание всех компонентов,
- предельные концентрации всех компонентов,
- определяемые компоненты,
- максимальное время анализа и
- область применения (например, лаборатория, производственный контроль, взрывоопасное производство).

3.11.1. Коллектор фракций в ГХ

Сбор интересующих фракций в аналитических целях, для быстрого выделения и идентификации чистых веществ, часто применяется в жидкостной хроматографии, так как жидкие фракции проще собрать в коллекторе фракций. Для газовой хроматографии при этом, во-первых, должен применяться неdestructивный детектор, для чего подходит универсальный детектор по теплопроводности. На выходе ДТП помещают карусель с низкотемпературной вакуумной ловушкой для сбора отдельных фракций. Для того чтобы набрать достаточное количество вещества, одно и то же разделение проводится многократно и соответствующие фракции собираются в соответствующие ловушки. Эти фракции могут затем подвергаться в дальнейшем более точным исследованиям или структурному анализу спектроскопическими методами.

3.12. Высокотемпературная газовая хроматография

Название «Высокотемпературная газовая хроматография» (ВТГХ) точно определяет суть этого метода. В общем о ВТГХ говорят, начиная с рабочих температур примерно от 330–350 °С, верхняя граница температуры лежит для некоторых стационарных фаз при 450 °С. Формально ВТГХ – лишь расширение газовой хроматографии до более высоких рабочих температур. Поэтому одно время оспаривалась правомерность выделения ее в отдельный вид ГХ. Так как для газовой хроматографии при рабочих температурах больше 350 °С все же необходимы специально разработанные хроматографы, детекторы и колонки, целесообразно и, между тем, общепринято это выделение в отдельный вид ГХ [3.75].

Небольшое различие между так называемой обычной ГХ (<330 °С) и ВТГХ означает, выражаясь в терминах молекулярных масс анализируемых веществ, расширение области применения от максимально ~ 600 г/моль до ~ 1000 г/моль. На практике это значит очень много. Вследствие этого неожиданно попадают проблемы разделения, которые, казалось бы, должны были решаться смежными методами, такими как сверхкритическая флюидная хроматография (СКФХ) или ВЭЖХ, в потенциальную область приложения газовой хроматографии.

Вне зависимости от того, что другими капиллярными или некапиллярными хроматографическими методами не так просто превзойти эффективность газовой хроматографии, ВТГХ обладает неоспоримыми преимуществами перед другими методами разделения. Во-первых, она располагает очень эффективными системами прямого ввода пробы, которые могут работать с минимальными количествами образца, с другой стороны, она может легко комбинироваться с рядом более чув-

ствительных, как универсальных, так и специфических, детекторов. Уже возможность использовать пламенно-ионизационный детектор (ПИД) вместо УФ детектора может быть решающим аргументом для использования ВТГХ. Используя ПИД, к примеру, лучше проводить быстрое и надежное количественное определение сопутствующих компонентов. Если дополнительно требуется структурный анализ, то сравнительно просто подсоединить масс-спектрометр.

Таким образом, высокотемпературная газовая хроматография, если она может быть применена, это метод для количественного и качественного следового анализа в сложных смесях. Следует оговориться, что газовая хроматография – это, прежде всего, метод разделения для более или менее аполярных соединений. Если полярные вещества исследуются газохроматографически, предварительно нужно провести их дериватизацию, т.е. перевести в аполярные, термостабильные производные.

Примечательно и то, что из хорошо дезактивированных капилляров очень часто элюируются еще и те соединения, от которых из общих соображений этого нельзя было бы ожидать. Во-первых, это, объясняется удивительно высокой термостабильностью многих классов соединений на очень инертной капиллярной колонке; с другой стороны, полярные функциональные группы, которые делают молекулу термически лабильной, часто достаточно защищены против нуклеофильных атак при высоких температурах.

3.12.1. Колонки для ВТГХ

Для высокотемпературной газовой хроматографии применяются, прежде всего, колонки из боросиликатного стекла, плавленого кварца и, в последнее время, также металлические капилляры. Из всех материалов самое широкое применение находят стеклянные капилляры. Ситуация, когда стеклянные капилляры предпочитают капиллярам из плавленого кремния, находится в полном противоречии с сегодняшней практикой ГХ, где в качестве материала колонок используют, прежде всего, плавленый кварц. В то время как оба материала с нанесенным полисилоксаном до рабочих температур ~ 330 °С можно рассматривать как равноценные, то при более высоких температурах предпочтение, однозначно, отдается стеклу.

Если в качестве газа-носителя используется водород, что, в основном, следует рекомендовать для ВТГХ, капилляры из плавленого кварца могут быть потенциальной угрозой безопасности – независимо от того, покрыты ли они полиимидом или, как часто рекомендуют для ВТГХ, алюминием. Капилляры плавленого кварца, если они работают в области температур ВТГХ, вскоре теряют большую часть своей первоначальной гибкости и становятся хрупкими. К тому же капилляры с алюминиевым покрытием не переносят быстрого охлаждения, так как коэффициенты расширения плавленого кремния и алюминия находятся далеко друг от друга. Спонтанное разрушение или даже взрыв колонки вследствие усталости материала – не редкость. Для стекла подобное непредсказуемое поведение неизвестно.

Хотя рабочие температуры лежат между 330 и 460 °С, выбор пригодных стационарных фаз ограничен, так, к примеру, большой класс полиоксидановых фаз не

может применяться в ВТГХ; в то же время имеется широкий круг полисилоксановых фаз с высокой температурной стабильностью. Технология ВТГХ колонок основывается на химических фактах, которые определяют, при каких условиях возможна капиллярная газовая хроматография при высоких температурах, но одновременно они же определяют, где находятся границы метода.

3.12.2. Инструментальные условия

С ВТГХ для многих газовых хроматографов настает момент истины. Теперь оказывается, что лишь немногие приборы отвечают связанным с этим методом требованиям. Особые требования предъявляются к:

- системе ввода пробы,
- термостату колонок,
- регулировке газа-носителя и
- детекторам и их обогреву.

Основные требования к системе ввода пробы в ВТГХ:

- проба должна наноситься на колонку без потери высококипящих компонентов;
- термический нагрев пробы в системе ввода не должен превышать последующую максимальную температуру колонки, чтобы минимизировать разложение и изомеризацию веществ;
- должна быть возможность простого ввода пробы — как вручную с помощью шприца, так и автодозатором.

Из распространенных сегодня систем ввода пробы с делением потока или без деления потока, испарением с программированием температуры или прямым вводом на холодную колонку безоговорочно рекомендован может быть только последний метод. Все другие системы ввода пробы, в которых проба предварительно нагревается в инжекторе и подается в колонку в виде пара, сохраняют опасность пиролиза компонентов пробы и являются, прежде всего в анализе следовых количеств, источниками потенциальных ошибок. Для сильно нагруженных проб рекомендуется защитить систему путем включения, например, предварительного разделения методом ВЭЖХ или сверхкритической флюидной экстракцией (СКФЭ).

Применяемые в основном в ГХ в качестве газов-носителей гелий и водород лишь незначительно отличаются по своим молекулярным массам. Поэтому диффузия молекул пробы в обеих подвижных фазах одинакова. Вязкость обоих газов, однако, очевидно различается: она у водорода примерно вдвое меньше, чем у гелия, вследствие чего H_2 существенно более гибко реагирует на неоптимальные потоки газа-носителя.

Повышение температуры колонки всегда ведет к расширению объема газа и, вместе с тем, к уменьшению потока газа-носителя, если только (как обычно) давление газа поддерживается постоянным. При этом поток газа автоматически снижается до величины, при которой достигается оптимальная высота тарелки. Обычная используемая мера разделяющей способности колонки — высота теоретической тарелки оказывается для ВТГХ действительно неудачной величиной. Она ука-

зывает на то, что разделяющая способность капиллярной колонки более или менее постоянна и не зависит от температуры колонки. Однако на практике это не так.

Если сравнивать разделения при постоянном давлении с разделениями при постоянном потоке, то получается, что в первом случае разделение лучше, а поток газа остается приблизительно в оптимуме. Это расширение рабочей области за счет поддержания постоянного давления нужно ценить на практике несравнимо выше, чем поддержание оптимальных условий для потока. Так как неоптимальные скорости потока являются правилом для ВГХ, то лучший газ-носитель для ВГХ водород, поскольку тогда, ввиду низкой вязкости газа, можно ожидать самое незначительное снижение эффективности.

Стандартный детектор в газовой хроматографии – это пламенно-ионизационный детектор. Равным образом наиболее подробно описанные в литературе примеры использования ВГХ использовали ПИД. Как и следовало ожидать, не каждый ПИД можно применять при температурах > 400 °С. Проблемы начинаются с пламенной форсунки. Многие изоляционные материалы становятся хрупкими при температуре выше 370 °С. Как правило, в ПИД для ВГХ применяют керамические изоляторы.

Электронная часть детектора должна быть хорошо термически экранирована от пространства, где происходит ионизация, так чтобы кабельная проводка не

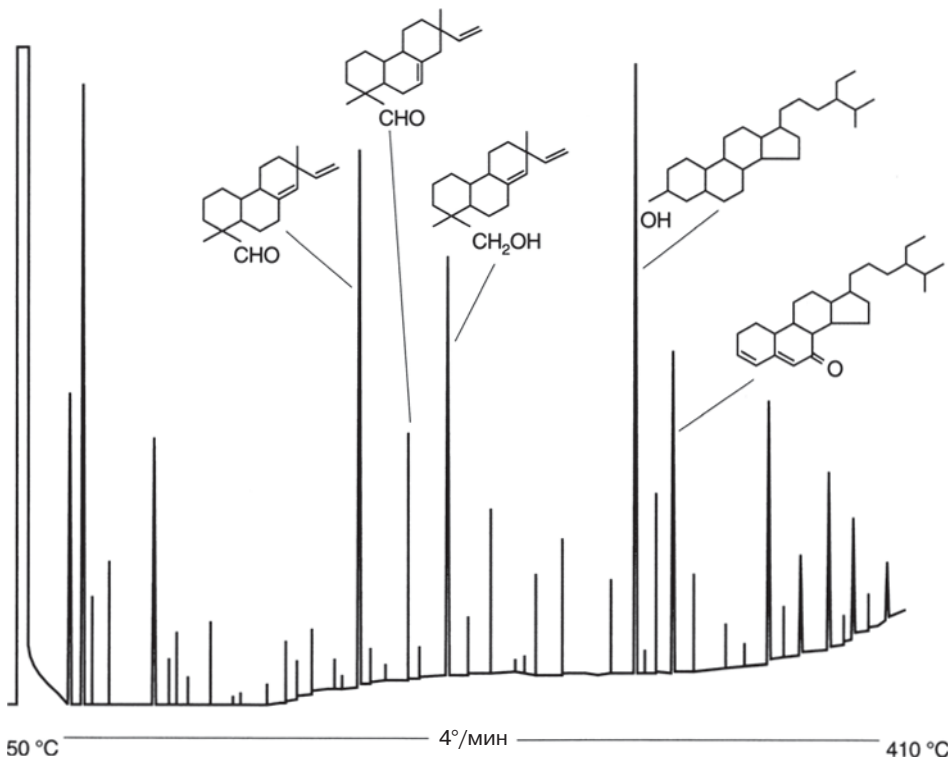


Рис. 3.42. ПИД хроматограмма смолистых побочных продуктов промышленной деревообработки

находилась при высоких температурах. Обогрев детекторов должен быть настроен на оптимальную передачу тепла и должен быть в состоянии давать нагрев до 500 °С. «Холодные места» в конце разделительной системы могут приводить к конденсации уже разделенных пиков и свести на нет все разделение.

Наряду с ПИД самым важным детектором в капиллярной хроматографии является масс-спектрометр. Он может применяться как для качественного анализа с записью полных масс-спектров или, при регистрации конкретной массы, как масс-селективный детектор для количественного определения отдельных компонентов в сложных смесях. У многих коммерчески доступных приборов возникают трудности с подключением ВТГХ колонки к МС. Температура переходника должна соответствовать максимальной рабочей температуре колонки и поддерживаться постоянной на всей его длине. Обычная сегодня практика, когда капиллярная колонка из плавленого кварца вводится непосредственно в источник ионов спектрометра, приводила бы при высоких рабочих температурах к проблемам стабильности и контаминации.

Интерфейс ВТГХ/МС с коаксиальным введением реакционного газа и газаносителя и дополнительный обогрев стенок источника ионов полностью соответствует вышеупомянутым критериям.

Стеклянный капилляр без труда переносит высокие рабочие температуры, и система позволяет использовать как водород в качестве газа-носителя, так и применять все обычных в ГХ/МС виды ионизации (ЭУ и ХИ с вариациями реакционного газа). На рис. 3.42 в качестве примера показана высокотемпературная газовая хроматограмма побочных продуктов деревообработки.

3.13. Анализ паровой фазы (Headspace анализ)

Для газовой хроматографии пробы должны быть либо летучими, либо газообразными и не должны содержать слишком много нелетучих компонентов. Пробы, содержащие соль или взвешенные вещества, не могут непосредственно вводиться на колонку ГХ. В таких случаях часто должна проводиться предварительная очистка проб, при которой, конечно, состав летучих компонентов не должен меняться. Простой и элегантный метод — это анализ паровой фазы (Headspace analysis), в котором анализируется состав газовой фазы над пробой, так что принципиально определяются только летучие компоненты [3.76].

Этот метод, таким образом, особый вид газовой экстракции, которая для летучих веществ всегда является более предпочтительной, чем также возможная жидкостная экстракция. Вследствие того, что вся обработка пробы происходит в закрытом сосуде и кроме термостатирования не нужны никакие другие манипуляции (как это имеет место при жидкостной экстракции), этот метод имеет все предпосылки для простой автоматизации [3.77]. Наряду с многочисленными применениями в технической, фармацевтической и косметической промышленности этот метод находит также широкое приложение в экологическом анализе, медицине и исследовании пищевых продуктов.

Если нужно выбрать подходящий метод анализа для данной задачи, то наряду с такими традиционными требованиями, как чувствительность, точность и пра-

вильность, решающую роль играет сегодня также возможность автоматизации. При рутинном анализе окружающей среды, с одной стороны, увеличивается число проб, а с другой стороны, необходимо более высокое качество анализа следовых количеств. Для этого особенно успешно может применяться анализ паровой фазы, который уже давно применяется для определения спирта в крови. Чтобы добиться хороших результатов, нужны, тем не менее, интенсивные предварительные исследования для выявления скрытых источников методических ошибок [3.78].

3.13.1. Практика проведения анализа паровой фазы

При анализе паровой фазы речь идет с методической точки зрения о газовом анализе. Соответственно применяются те же самые дозирующие устройства, как газовые шприцы или петли. При этом в противоположность обычной газовой аналитике речь идет о косвенном методе, который делает возможным высокочувствительный анализ летучих компонентов со средним до высокого давлением пара в жидких или твердых пробах. Также возможно определение растворенных газов в жидких или твердых пробах. В зависимости от числа стадий газофазной экстракции при этом различают два метода: статический и динамический анализ.

3.13.1.1. Статический анализ паровой фазы

Статический метод основывается на анализе паровой фазы над твердой или жидкой пробой в закрытой системе. Газовая проба однократно забирается из паровой фазы, находящейся в специальном для этого анализа сосуде. В момент забора пробы в паровой фазе в системе должно установиться термодинамическое равновесие между конденсатом и газообразной фазой [3.79]. Для повышения давления пара и, вместе с тем, для повышения концентрации компонентов пробы в паровом пространстве пробу принято нагревать до необходимой температуры.

Жидкая или твердая проба помещается в сосуд для анализа паровой фазы, который герметично закрывается резиновой крышкой. Пробы выдерживаются в термостате при постоянной температуре до тех пор, пока для летучих веществ не установится равновесие между пробой и газовым пространством. Затем может отбираться проба газовой фазы [3.80]. Чаще и проще всего это осуществляется газонепроницаемыми шприцами, у которых, однако, даже в том случае, если шприц и был подогрет, может происходить фракционирование пробы из-за разной силы адсорбции разных по полярности веществ. Более того, при высоких концентрациях компонентов из-за разницы температур между сосудом с пробой и шприцем может происходить конденсация компонентов паровой фазы, которая проявляется в плохой воспроизводимости анализа.

Эти недостатки удастся устранить, используя электропневматическую дозирующую систему [3.81]. При этом дозирующая игла прокалывает резиновую прокладку сосуда с пробой. Поскольку дозирующая игла непосредственно связана с входным устройством для газа-носителя, то она находится, таким образом, под тем же давлением, что и газ-носитель. Вследствие этого газ-носитель течет сначала через дозирующую иглу в сосуд с пробой, пока она также не наполнится газом-носителем до того давления. Когда этот период увеличения давления закончен,

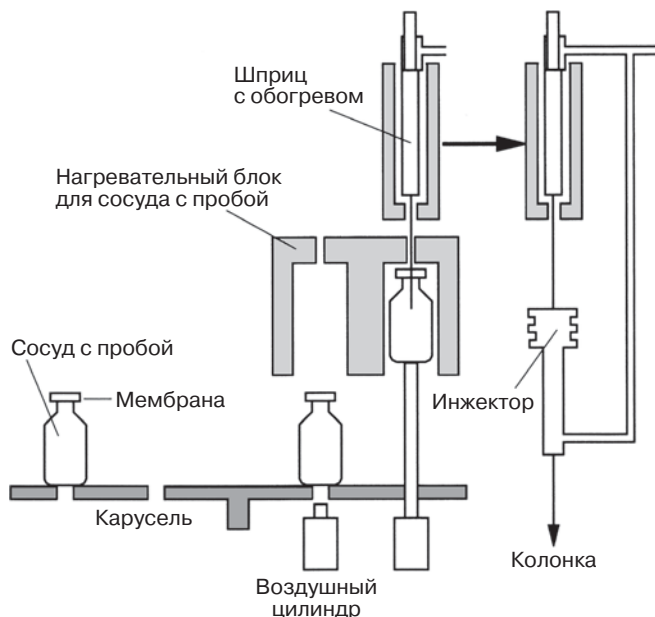


Рис. 3.43. Принцип работы статического автодозатора паровой фазы

магнитный клапан перекрывает подачу газа-носителя, и газ-носитель из сосуда с пробой поступает через иглу в колонку, т.е. газ вместе с летучими компонентами течет в колонку. Ввод пробы прерывается магнитным клапаном, открывающим подачу газа-носителя. Дозирующая игла обогревается, как и все другие линии, чтобы предотвращать адсорбцию и конденсацию.

Автоматизация устройства возможна с помощью автодозатора, который распределяет сосуды с пробой и друг за другом обрабатывает (рис. 3.43). За счет вращения карусели с пробирками под нагревательный блок одновременно всегда поступают две пробы. Сосуд с пробой, находящийся в самой внешней позиции, отправляется с помощью пневматики сначала в нагревательный блок. Теперь проба кондиционируется заданное время до установления равновесия. По окончании кондиционирования заданная масса пара забирается газонепроницаемым шприцем из паровой фазы. Шприц нагревают, чтобы предотвратить конденсацию. Наконец проба вводится на колонку и анализируется газохроматографически. Для очистки шприц промывают газом-носителем перед следующим циклом.

Один из самых важных параметров в статическом анализе паровой фазы — это длительность кондиционирования пробы. Эта величина дает период, за который устанавливается равновесие между твердой или жидкой пробой и паровой фазой. Время кондиционирования сильно зависит от матрицы и исследуемых компонентов. Следующий пункт — это температура кондиционирования. Этот параметр зависит от матрицы и определяется ею. Далее нужно обращать внимание, что для проб, которые содержат воду, температура кондиционирования должна быть ниже точки кипения воды. Слишком большое количество воды в газовой фазе может вести к эффекту «хвостов» и, в худшем случае, тушению пламени в ПИД.

Статический анализ паровой фазы, в настоящее время, находится на высоком техническом уровне, поскольку он связан с персональными компьютерами и, тем самым, имеет широкие возможности для автоматизации. Он применяется как при абсолютных измерениях, так и при относительных измерениях для газообразных/жидких и газообразных/твердых систем. Без предварительного обогащения можно проводить анализы твердых и жидких проб, таких как вода, сточные воды, отстой, земля, отбросы и похожие матрицы [3.82]. Этот метод применяется при исследовании термодинамики и кинетики реакций, а также в физике, к примеру, для характеристики сорбционного поведения и пористости катализаторов и сорбентов.

При этом особенно популярны относительные измерения, при которых сравниваются только площадь пиков в идентичных условиях измерения. Однако и это во многих случаях уже ценная помощь для запланированных измерений классическими методами, так как этим методом можно проводить ценные предварительные проверки, так называемые скрининги. Это дает возможность во многих случаях заметно сократить затраты времени и затраты на персонал, а, вместе с тем, и стоимость измерений классическими методами — фактор, который как раз сегодня имеет большое значение в научно-исследовательских и опытно-конструкторских разработках.

3.13.1.2. Динамический анализ паровой фазы

Под определение динамических анализов паровой фазы подпадает целый ряд методов, при которых твердая или жидкая проба подается с непрерывным потоком газа. При этом инертный газ так долго пропускается над пробой или через пробу, что летучие компоненты десорбируются или экстрагируются почти полностью. Динамический анализ паровой фазы первоначально разрабатывался для того, чтобы собранные подходящим адсорбентом на рабочем месте вредные вещества в другом месте с помощью термодесорбции быстро перенести в газовый хроматограф и, тем самым, определить величину ПДК на рабочем месте.

Количественное заключение можно делать только при полной экстракции аналитов в газовую фазу. Газовый экстракт, как правило, слишком разбавлен для непосредственного анализа, и перед определением его нужно снова сконцентрировать. Это происходит, как правило, с помощью сорбционных средств (активированный уголь, Tenax) или холодных ловушек (криофокусировка). Оба метода сильно отличаются в приложении, проведении и оценке.

Сорбционные материалы для последующего определения сорбированных компонентов либо прогреваются (Tenax), либо промываются жидкими элюентами. Ввод замороженных компонентов проб осуществляется их спонтанным испарением с помощью специального электрического нагревателя с очень высокой скоростью нагревания. Автоматические системы продувки и улавливания оснащены нагреваемым сосудом для жидкой пробы и термодесорбером для твердой пробы. Выдувание летучих компонентов и обратная продувка веществ из адсорбционной ловушки через нагреваемую линию передачи в газовый хроматограф происходят в автоматическом цикле [3.83].

Сегодня для самых различных задач в распоряжении имеется широкий круг адсорбционных трубок [3.84]. Этим методом, например, исследуются загрязнен-

ные пробы земли. Можно также проводить концентрирование вредных веществ из воздушных проб [3.85]. Динамические методы хорошо подходят для анализа питьевой воды на присутствие следов органических растворителей. Путем использования больших количеств пробы можно повысить чувствительность определения. Затраты на приборы в динамическом методе все-таки заметно выше, чем в статических методах, у которых к тому же существуют четкие термодинамические соотношения в момент отбора пробы. Статический метод чаще применяется из-за хорошей воспроизводимости результатов измерений.

3.13.2. Основы количественного анализа паровой фазы

Если согласно описанному методу из паровой фазы отбирается аликвота, то измеряемая в результате площадь пика является мерой количества соответствующего компонента в газовой фазе над пробой. Количество каждого компонента в паровой фазе дается его парциальным давлением p' , которое, поэтому, будет пропорционально площади пика F . До сих пор речь идет о простом газовом анализе, и хроматограмма дает вначале только состав газовой фазы над пробой. Возможно, этого результата будет уже достаточно, если о пробе хотят получить лишь поверхностное представление.

Намного чаще ставится задача определить в составе газовой пробы концентрацию определенного компонента. Это также возможно, так как парциальное давление зависит, в том числе, от концентрации компонента в пробе. Парциальное давление вещества над раствором по закону Генри выражается через концентрацию вещества в растворе x , давление пара p^0 чистого вещества и коэффициент активности вещества в растворе Ψ :

$$p' = x \cdot \Psi \cdot p^0.$$

Если заменить парциальное давление p' на соответствующую площадь пика F , то получится:

$$x = F/(\Psi \cdot p^0).$$

Желаемую концентрацию x можно рассчитывать, если продукт $\Psi \cdot p^0$ известен или определяется с помощью калибровки. Так как коэффициент активности, который описывает межмолекулярные взаимодействия между растворителем и растворенным веществом, неизвестен, то калибровка должна проводиться практически в каждом случае. Ее нужно проводить с чистым веществом в тех же самых условиях, что и анализ, а также с той же самой матрицей. Это означает, что нужно применять метод добавок, когда для анализа к пробе добавляют определенное количество определяемого вещества. Соответствующий пик вследствие этого увеличится, и так как прирост соответствует добавленному количеству, то отсюда легко определить первоначальную концентрацию.

Получаемая в результате анализа паровой пробы хроматограмма дает сначала распределение концентраций в газовой фазе. Вследствие этого метод может применяться также в газовом анализе. Это даже очень просто реализовать, если для сбора газовых проб используются предварительно вакуумированные сосуды для

парового анализа. Для этого прокладка пустого, но уже закрытого сосуда прокалывается иглой от шприца, и сосуд вакуумируют насосом. Взятие пробы также просто: прокладку снова протыкают иглой от шприца и дают исследуемой газовой пробе заполнить сосуд. Как пример можно упомянуть исследование воздуха на рабочем месте для определения концентрации вредных веществ.

3.13.3. Холодная система ввода как метод обогащения

Холодная система ввода предоставляет возможность улучшить чувствительность стационарного метода анализа паровой фазы (англ.: SHS). Как для экологического анализа, так и для контроля качества технических продуктов газовая хроматография паровой фазы (англ.: HSGC) представляет собой очень элегантный метод. Измерительная система избавлена от влияний матрицы из окружающей среды; здоровье, рабочие места и места проживания остаются незатронутыми, и, одновременно, происходит явное обогащение летучих вредных веществ и ингредиентов из жидкой или твердой матрицы. Так как экологический анализ связан главным образом с анализом следовых количеств, то вопросы относительно границ обнаружения в случае неблагоприятных коэффициентов распределения часто остаются открытыми.

Поэтому имеется большое число попыток улучшить чувствительность статического метода анализа паровой фазы. Холодная система ввода в качестве системы подачи пробы предлагает метод с программированием температуры с делением или без деления потока (англ.: Split/Splitless) и возможностью одновременного внутреннего предконцентрирования [3.86]. Предконцентрирование следов летучих вредных веществ и ингредиентов из паровой фазы становится возможным в двух методах:

- криофокусировка и/или
- адсорбция на подходящем адсорбенте (Tenax).

Из-за простой возможности повторять ввод пробы из соответствующего парового пространства в систему ГХ предпочтение отдается обогащению в холодной системе ввода пробы. При этом многократный ввод пробы может осуществляться как вручную, так и автоматически двумя методами:

- МИП – многократный ввод паровой фазы и
- МЭП – многократная экстракция паровой фазы.

В то время как при МИП повторный ввод пробы происходит для одной и той же пробы, но которая распределена по нескольким сосудам для анализа паровой фазы, многократный ввод пробы при МЭП происходит для одной и той же пробы из одного и того же сосуда. При этом МЭП является, собственно говоря, методом для количественного анализа паровой фазы, который в противоположность МИП должен был бы применяться совместно с описанным здесь методом обогащения пробы, только если имеющееся количество пробы для исследования очень мало. Так, десятикратным вводом пробы методом МЭП можно, например, проанализировать испарения одной-единственной пихтовой иголки. Естественно, при наличии достаточных количеств анализируемого вещества будет использоваться и

большие количества пробы. Тем не менее, на практике это случается не всегда, и этот метод предоставляет действенные возможности в следовом и микроанализе, например, при характеристике сколов лака (транспортные аварии), остатков грязи под ногтями (преступление с применением насилия) и т.д.

Нагревание и охлаждение происходят электрически, причем в случае низкотемпературных компонентов возможно дополнительное охлаждение с помощью CO_2 . Ввод пробы происходит известным способом с помощью микролитрового шприца. Заданную температуру, время для возможной отдувки растворителя, конечную температуру, температуру и время ступеней программирования температуры, скорость нагревания, а также время одного цикла ГХ можно программировать с помощью микропроцессора.

Если ввод пробы происходит в жидком виде, то она замораживается, и, таким образом, из иглы шприца не может происходить испарение. Камера инжектора нагревается только после окончания ввода пробы. Для газообразных проб возможно понижение температуры до -78°C с применением CO_2 . Наоборот, при соответствующем программировании температуры холодная система ввода пробы может применяться как обычная система ввода пробы с обогревом.

3.14. Выводы и обзор

Газовая хроматография вместе с ВЭЖХ относится к самым важным методам разделения в рутинном анализе. В течение 40 лет своего развития она достигла высокого методического и технического уровня. Прошло много поколений приборов, некоторые из которых получили очень широкое распространение. Она исключительно надежна, позволяет относительно быструю разработку методов и охватывает широкий круг детекторов с высокой чувствительностью и специфичностью. Комбинированием со спектроскопическими методами эти свойства можно применять к проблемам, лежащим в самых отдаленных областях. Вместо сенсационных инноваций развитие последних лет характеризовалось постоянным улучшением деталей, которые имеют значение как для ежедневной практической работы, так и для выявления новых областей применения.

Сегодня газовые хроматографы есть в каждой лаборатории, которая занимается исследованием летучих смесей или веществ, которые можно перевести в летучее состояние. ГХ преимущественно применяется к качественному и количественному анализу испаряемых соединений в пробах разного состава. Определение физико-химических констант и препаративные разделения с помощью ГХ возможны, но играют подчиненную роль.

После вытеснения в большинстве лабораторий наполненных колонок капиллярными колонками, развитие последнего времени обозначено преимущественно успехами в деталях, которые способствуют расширению возможностей метода (возможности разделения, чувствительность, точность, воспроизводимость, время анализов) и удобству его применения, а также повышают его устойчивость к помехам, снижают затраты при его использовании и открывают новые области приложений. Хотя следующие из теории пределы возможностей метода уже очевидны, ГХ ни в коем случае не находится в конце своего развития. Капиллярная ГХ

будет все больше и больше использоваться людьми, которые имеют лишь незначительные знания об этом микрометоде. Соответственно, велика разница между имеющимся и действительно задействованным потенциалом ГХ.

Газовая хроматография может применяться только к летучим соединениям, поскольку массоперенос происходит в газообразной подвижной фазе, и только такие соединения могут транспортироваться газом-носителем по колонке, давление пара которых при выбранных рабочих температурах в системе, и особенно в колонке, достаточно высоко. Таким образом, сразу становится понятным, что выбор и регулировка температуры – это важная часть оптимизации газохроматографической системы. Особое значение регулировка температуры имеет для термостата. Только стабильный изотермический процесс или воспроизводимое программирование температуры позволяет получать воспроизводимое время удержания. Это совершенно необходимо, если производится компьютерная обработка данных.

ГХ позволяет определять крайне низкие количества вещества (пико- или фемтограммы), которые, кроме того, существуют еще в очень низких концентрациях в разнообразных матрицах (следовой анализ). Разделение и выделение больших количеств вещества, напротив, более трудно, если одновременно требуется высокое разрешение (препаративная ГХ). Внедрение высокоэффективных капиллярных колонок значительно увеличило возможности ГХ, особенно в следовом анализе. Труднолетучие соединения могут разделяться в капиллярных колонках более мягко, т.е. при более низких температурах. Новые типы колонок, естественно, привели также к значительным изменениям в инструментальной базе, необходимой современной аналитической ГХ. Так как на практике сегодня для ГХ анализа не очень сложных смесей еще применяются наполненные колонки, то большинство продаваемых сегодня ГХ приборов рассчитано на применение этих двух сильно различных типов колонок. Разумеется, техническая перестройка пневматической системы неизбежна.

3.14.1. Хроматографические колонки

Капиллярные колонки, которые в целом победили в лабораторном анализе, находят все большее применение и в промышленной ГХ. В качестве материала колонок доминирует «плавленый кварц» из-за инертности чистой поверхности кварца и гибкости тонкостенных трубок, которые снабжены внешним покрытием из полиимида. В последнее время альтернативой являются тонкостенные капилляры из нержавеющей стали, крепкие и гибкие, которые благодаря дезактивации в той же мере или даже еще более инертны, чем кварцевые капилляры.

Капиллярная колонка особенно требовательна к вводу пробы и к подключению колонки к детектору, а также к свойствам используемых детекторов. В зависимости от вида анализируемой пробы и от цели анализа для капиллярных колонок должны применяться разнообразные методы ввода пробы, например, с делением или без деления потока, прямой ввод в колонку и т.д. Техника подсоединения такого миниатюрного типа колонок должна быть свободна от мертвых объемов и устойчива к температуре примерно до 400 °С, а также гарантировать плотность



соединений при сильно изменяющихся температурах, как это обычно имеет место при использовании программирования температуры. От инжектора через колоночный термостат до детектора современные инструменты должны позволять точную установку, регулировку параметров, а также их временное программирование. Используемые колонки, которые могут содержать стационарные фазы разной полярности, должны быть, естественно, достаточно устойчивы к температуре. Они не должны уже после короткого времени использования разрушаться или ухудшать детектирование за счет выноса продуктов деструкции. ГХ приборы должны быть снабжены измерительными и регулируемыми устройствами для газаносителя и для газов, снабжающих детектор (ПИД), и работающими настолько надежно, чтобы проводить воспроизводимые измерения. В общем, газохроматографические инструменты должны позволять проводить анализы, свободные от систематических и от слишком больших статистических ошибок.

Чаще всего применяются тонкие капилляры длиной от 10 до 60 м, внутренние стенки которых покрыты тонкой пленкой жидкой стационарной фазы. Так как пленки, удерживаемые исключительно адсорбционными взаимодействиями, термодинамически не стабильны, то производство прочно удерживаемых пленок на одновременно инертной поверхности – это ключевая проблема получения колонок. Стабильные пленки можно производить *in situ* поперечным сшиванием полимерных цепочек стационарной фазы и, прежде всего, химическим соединением полимерных цепочек с внутренней поверхностью стенки, прошедшей предварительную обработку (химически связанные фазы), за счет подходящих реакционных групп. Степень связывания и сшивания должна быть, тем не менее, настолько незначительна, чтобы сохранить у фазы свойства жидкости.

После пионерских работ 10–15-летней давности совершенствование колоночной технологии проходит, между тем, абсолютно незаметно для пользователей в лабораториях фирм-производителей, включая специалистов химии поверхности и полимерной химии, правда, в условиях потери прозрачности, так как фирмы едва ли сообщают детали о процессе изготовления.

Актуальный коммерческий ассортимент неполярных стационарных фаз охватывает толщины пленки от 0,1 до 5 мкм при величине внутреннего диаметра от 0,15 до 0,53 мм. Вместе с тем, благодаря изменению внутреннего диаметра и толщины пленки соотношение фаз β можно варьировать в широких пределах (от 30 до 1300). Это отражается на факторе удерживания k' , рабочей температуре колонок и времени анализов, а также и на эффективности колонок и их нагрузочной емкости. Таким образом, по сравнению с наполненными колонками имеется существенно более широкая возможность для выбора колонки, соответствующей анализируемой пробе.

Совершенно иная картина для селективности: из-за высокой разделительной эффективности капиллярных колонок сначала полагали, что имеющиеся задачи по разделению могут быть выполнены с небольшим числом стационарных фаз. Так как химически привязанные полидиметилсилоксан и полиметилфенилсилоксан с незначительным содержанием фенильных групп (примерно 5%) отличаются высокой термостабильностью, эти фазы играют роль рабочей лошади, хотя их разделяющая способность основывается почти исключительно на неспецифичес-

ких взаимодействиях. С ростом содержания фенил-, цианопропил- и других групп в силоксановой матрице уменьшается термостабильность. Поэтому усилия производителей направлены на фиксацию полярных разделяющих жидкостей, чтобы соответствовать потребностям в селективности при исследовании все более сложных проб. Наряду с химически привитыми полиэтиленгликолями, например, теперь также доступны капилляры с ПАГ фазами (полиалкенгликоль, полиэтилен- и полипропиленгликолевые эфиры).

С другой стороны, производители колонок предлагают все в большей мере специальные колонки с жидкими фазами индивидуального состава (в большинстве случаев, полисилоксаны с оптимизированным содержанием фенильных и цианопропильных групп). Они используются в стандартизованных методах анализов (например, «диоксиновая колонка»), разумеется, снова без указаний относительно точного состава фазы и способа изготовления.

Актуальные усилия производителей колонок направлены также на дальнейшее улучшение инертных свойств колонок как существенную предпосылку для анализа следовых количеств полярных соединений, воспроизводимости важных для колонок параметров (параметры удерживания, термостабильность и устойчивость к растворителям, отсутствие фона), а также тестирования колонок более чувствительными тестами.

Преимущества водорода как газа-носителя используются все большим числом пользователей, даже если это связано с дополнительными мерами предосторожности. Так же общепризнанной необходимостью является удаление самых незначительных следов кислорода из газа-носителя для защиты полярных стационарных фаз.

Второй тип колонок, тонкослойные капиллярные колонки (PLOT колонки), объединяет преимущества адсорбционной ГХ с эффективностью капиллярных колонок. На внутренней стенке этих колонок фиксируется тонкий слой частиц адсорбента очень мелкого зёрнения с диаметром < 1 мкм. В качестве стационарной фазы в настоящее время коммерчески доступны модифицированный Al_2O_3 , молекулярные сита, пористые полимеры и углеродные молекулярные сита.

Эти PLOT колонки с длиной от 10 до 50 м и внутренними диаметрами 0,32 или 0,53 мм находят все большее применение в анализе газа и летучих полярных и неполярных соединений. Мостом к газо-жидкостной хроматографии являются капиллярные колонки с нанесенным слоем из графитизированной сажи, покрытой жидкой фазой (англ.: CLOT, Carbograph). Разделение происходит при этом согласно комбинированному адсорбционно-распределительному механизму (газо-твёрдо-жидкостная хроматография).

Наиболее исследуемыми направлениями сегодня являются разделение энантиомеров, высокоскоростная ГХ и высокотемпературная ГХ.

3.14.1.1. Разделение энантиомеров

Прямой ГХ анализ энантиомеров на хиральных стационарных фазах получил бурное развитие в начале девяностых годов, когда стали коммерчески доступными капиллярные колонки с модифицируемыми циклодекстринами (ЦД). Между тем, очень широкий спектр разделяемых без дериватизации соединений, которые раз-

деляются на различных функционализированных α -, β -, γ -ЦД, простирается от неполярных углеводородов до относительно полярных соединений. Преимущественно алкилированные или ацилированные ЦД используются как стационарные фазы либо непосредственно, либо растворенными в полисилоксановых фазах. Дальнейшее развитие последнего типа фаз ведет к колонкам с химически привитыми ЦД.

Энантиоселективность этих фаз обусловлена механизмом включения (инклюзии), а также гидрофобными и полярными взаимодействиями. Тем не менее, из большого числа опубликованных приложений до сих пор нельзя сделать окончательное суждение о механизме разделения, так как у химически сходных соединений уже незначительные структурные изменения (например, положение заместителя) могут приводить к отчетливому изменению в хиральном распознавании. Так как очевидно, что отдельные виды взаимодействий, в зависимости от природы вещества, вносят различный вклад в дискриминацию энантиомеров, то при современном уровне знаний невозможно делать какие-либо предсказания о том, удастся ли вообще разделение энантиомеров и на какой ЦД фазе. Разработка методов анализов происходит в настоящее время по методу «проб и ошибок». При этом может быть полезно использование опыта других авторов, сохраненного в базах данных.

3.14.1.2. Скоростные анализы (экспресс-ГХ)

Из различных теоретически возможных путей для сокращения времени анализа уменьшение внутреннего диаметра тонкопленочных капиллярных колонок в сочетании с водородом в качестве газа-носителя доказало себя как наиболее эффективное. Так как минимальная высота тарелки пропорциональна внутреннему диаметру капилляра, то необходимое для конкретного разделения число тарелок при меньшем сечении колонки может реализоваться на более короткой колонке и, тем самым, также за более короткое время. Уже в 1962 году было описано разделение 15 компонентов в течение 2 секунд на колонке длиной 1,2 м и с внутренним диаметром 35 мкм.

Хотя тонкие капиллярные колонки с пленками, стабильными к растворителям, коммерчески доступны, они еще мало распространены, так как незначительная емкость и маленькие объемы проб предъявляют высокие требования к хроматографической аппаратуре:

- быстрый ввод минимальных количеств пробы при наличии высокого противодавления,
- предотвращение уширения пиков вне колонки путем выбора соответствующего детектора и минимизации мертвых объемов на всем пути газа от инжектора до детектора,
- высокочувствительные детекторы с очень малым временем отклика,
- быстрая электронная регистрация и обработка данных,
- инертность системы.

В соответствии с этими требованиями колонки с внутренним диаметром до 0,1 мм могут еще использоваться в современных устройствах; для колонок с диаметрами < 0,1 мм требуются специальные приборы.

3.14.1.3. Высокотемпературная ГХ

Одной из наиболее достойных упоминания инноваций прошлого времени являются высокотемпературные колонки, которые делают возможными разделения при температурах до 450 °С. Сегодня капиллярные колонки с высоким соотношением фаз, незначительной адсорбционной активностью и стабилизированными жидкими пленками применяются в сочетании с подходящими методами дозирования и соответствующим образом настроенными приборами для рутинной работы при температурах колонок до 350 °С для разделения высококипящих, термически стабильных соединений. Примерами являются газохроматографически симулируемая дистилляция более высоких фракций нефти, а также анализ триглицеридов, олигомеров, низкомолекулярных полимеров и полициклических ароматических углеводородов (ПАУ). Для преодоления ограниченной термостабильности полиимидной оболочки был разработан термостабильный полиимид, а также капилляры из плавленого кварца с алюминиевым покрытием.

Как альтернатива кварцу, который при высоких температурах вследствие рекристаллизации становится шероховатым и ломким, представляет интерес боросиликатное стекло. Другой альтернативой являются с недавних пор капилляры из нержавеющей стали.

В последнее время удалось получить капиллярные колонки со стационарными фазами, стабильными до 460 °С, которые открывают – даже в сравнении с ВЭЖХ и СКФХ – новые возможности применения ГХ для высококипящих соединений. Вошедшее в оборот легитимное понятие «высокотемпературная ГХ» (ВТГХ) применяется при температурах колонок выше 300 °С.

3.14.2. Приборы/методики

В аналитической практике, когда часто большая серия проб должна быть проанализирована быстро и достоверно, большое значение имеет автоматизация всего ГХ анализа на самых различных его этапах. Самыми важными операциями для полностью автоматизированного проведения серийных ГХ анализов являются:

- подготовка пробы,
- измерение объема пробы,
- установка температуры инжектора, колонки, а также начало и конец программирования температуры,
- ввод пробы,
- получение, оцифровка и обработка сигнала,
- сохранение или выдача цифровых и/или аналоговых результатов анализа.

С помощью автоматизации ГХ анализа могут не только уменьшаться затраты на персонал, но и повышается надежность анализа за счет исключения ошибок, которые обусловлены человеческим фактором. Наряду со стандартным оснащением газового хроматографа – инжектором, термостатом и детектором – в будущем с ним будут более тесно, чем сегодня, комбинироваться системы пробоподготовки.

Для многих актуальных задач, например, исследование очень сложных смесей и определение все более низких следовых количеств в составе все более слож-



ных матриц, классическая конфигурация инжектор – колонка – детектор оказывается на пределе своих возможностей, даже при использовании капиллярных колонок высокого разрешения. К арсеналу методик, которые можно применять в зависимости от постановки задачи и свойств пробы (аналит/матрица), принадлежат для пробоподготовки/ввода пробы: ГХ паровой фазы, адсорбция/термосорбция, дериватизация, ЖХ-ГХ, термоэкстракция и пиролизическая ГХ. На одной колонке разделение происходит согласно давлению пара соответственно геометрии, на двух колонках – в параллельном или последовательном включении.

Благодаря все более широкому использованию микроэлектроники для управления приборами, получению и обработке данных приборы стали еще лучше, надежнее, проще в обслуживании и менее чувствительны к помехам. Это же справедливо и для нового поколения проимышленных приборов, с которыми теперь в режиме онлайн и полностью автоматизировано можно решать очень сложные задачи.

3.14.2.1. Пробоподготовка

Газохроматографический следовой анализ требует в большинстве случаев пробоподготовки для выделения и обогащения следовых компонентов из матрицы. Этот трудоемкий и подверженный ошибкам процесс (потери и/или контаминации) – в большинстве случаев наиболее уязвимый этап в цепочке пробоподготовка – измерение – сбор данных – оценка данных. Сегодня ручная пробоподготовка все еще составляет две трети всех трудозатрат при проведении анализа и на 25% обуславливает ошибки и неправильные заключения. Автоматизация пробоподготовки, т.е. автоматизация от момента непосредственного отбора пробы до момента включения ее в систему приборов и управления лабораторной информацией (англ.: LIMS, Laboratory Information Management Systems), будет основной темой в ближайшие годы. Наша экономика находится под сильным давлением необходимости улучшения организации и самого производства, чтобы сохранять свою конкурентоспособность. Также и в аналитике настоятельно необходима становится обучающая лаборатория «Lean laboratory», чтобы сократить бремя издержек, улучшить производительность и соответствовать требованиям к качеству и хорошей лабораторной практике (англ. GLP, Good Laboratory Praxis).

В связи с большим числом анализов наблюдается тенденция к автоматической, интегрированной подготовке проб таким образом, что введение стандартов, разбавление, дериватизация, нагрев, концентрирование или же твердофазная экстракция проводятся синхронно с прохождением анализа. Значительную экономию времени обещает автономное или в сочетании с ГХ (on-line) применение сверхкритической флюидной хроматографии (СФЭ). Ее применимость в стандартных методах в рутинной аналитике требует все же дополнительных исследований.

Из-за простоты выполнения широкое распространение получила твердофазная экстракция (ТФЭ). В настоящее время ряд фирм предлагает вакуумные фильтрационные установки и системы фильтрования под давлением для одновременной подготовки многих проб. Палитра сорбентов (модифицированные силикагели, органические полимеры, ионообменники) расширилась за счет внедрения графитизированного углерода.

Новейшей разработкой в этой области является твердофазная микроэкстракция (англ.: SPME), которая проводится полностью без растворителей. Концентрирование аналита происходит на тонком кварцевом волокне, покрытом полидиметилсилоксаном, которое на несколько минут помещается непосредственно в водную пробу или паровое пространство над пробой. С необходимыми для этого специальными держателями для волокна работают так же, как с микролитровым шприцом. Заключительный этап пробоподготовки включает термодесорбцию адсорбированных аналитов с поверхности волокна в нагретом инжекторе (с делением/без деления потока). Волокна могут применяться неоднократно. Этот вид экстракции можно автоматизировать с помощью автодозатора.

Для определения легколетучих компонентов в гетерогенных, труднолетучих или нелетучих матрицах есть смысл использовать газохроматографический анализ паровой фазы. При таком косвенном методе анализа определяется состав паровой фазы над пробой. Самым популярным примером этого типа анализа уже 25 лет является рутинный анализ содержания алкоголя в крови.

3.14.2.2. Ввод пробы

Капиллярные колонки, из-за их малых размеров, предъявляют высокие требования к дозировке пробы. В зависимости от цели анализа и вида пробы применяются разнообразные методы ввода пробы. Используя различные методы горячего или холодного ввода пробы, в принципе, можно удовлетворить эти требования и дозировать пробу на колонку в диапазоне от нл до мл. Использование столь большого — по сравнению с другими хроматографическими методами — диапазона требует детальных знаний о процессах, протекающих при дозировании. Несмотря на большие успехи в этой области здесь еще необходимы дальнейшие исследования. Поэтому выбор необходимых параметров в этих условиях представляет действительно трудоемкую задачу. В следовом анализе большие усилия направлены на дозировку больших объемов пробы, чтобы избежать процессов обогащения либо концентрирования экстрактов, которые приносят с собой и потенциальные ошибки.

Как для анализа воды, так и для сочетания ВЭЖХ/ГХ дозировка больших объемов воды представляет особенный интерес. Тем не менее, из-за высокой теплоты испарения воды, низкой концентрации водяного пара при насыщении газа-носителя (1 мкл воды соответствует примерно 50 мл газа-носителя, насыщенного водяным паром), а также чувствительности к влаге обычных стационарных фаз дозировка больших количеств воды создает значительные проблемы. Существует возможность, например, очень медленно дозировать водные пробы при холодном методе ввода в отдельную вставку, наполненную сорбентом, и удалять затем испарившуюся воду через делитель потока, в то время как аналиты концентрируются во вставке с сорбентом.

3.14.2.3. Программирование давления газа-носителя

Преимущества программирования давления газа или потока газа были очевидны уже в шестидесятые годы, но не нашли применения для набивных колонок из-за высоких затрат и несовершенства тогдашнего механического регулирования. С появлением в конце семидесятых годов капиллярных колонок из плавленого кварца



электронное программирование давления было переведено на коммерческую основу. В отличие от обычных регуляторов разработанная в последнее время комбинация датчика давления, регулятора давления и микропроцессора дает капиллярным колонкам определенные преимущества. Во-первых, можно легко и воспроизводимо создавать и программировать изменение давления, и, во-вторых, давление и поток можно пересчитывать друг в друга с учетом вязкости газа-носителя, температуры и геометрии колонки. Это позволяет оптимизировать продуктивность системы ввода и одновременно улучшить возможности детектора, управление кранами и подачу пробы.

Регуляторы в газовых хроматографах, которые обычно управляют давлением, заменяются электронным программированием давления, причем задание данных осуществляется с персонального компьютера. При электронном управлении потоком газа его можно поддерживать постоянным независимо от температуры колонки. Это создает дополнительные удобства для пользователя, так как желаемую скорость потока газа (линейную скорость или поток) можно вводить непосредственно с клавиатуры. Так как регулировка происходит посредством изменения давления, то поток остается, тем не менее, равным расчетной величине. Это позволяет, наряду с улучшенной воспроизводимостью величин удерживания, скомпенсировать увеличение вязкости газа-носителя при повышении температуры. Таким образом, при работе с программированием температуры линейную скорость можно удерживать вблизи минимума кривой Ван-Деемтера, причем при прямом соединении ГХ-МС в расчетах учитывается и вакуум на конце колонки.

Наибольшее преимущество программирования давления для системы ввода пробы состоит в экономии времени, уменьшении дискриминации и разложения пробы в горячем инжекторе, а также большем объеме вводимой пробы для введения пробы без делителя потока. С помощью метода однократного ввода с пневматическим ударом можно подавать в инжектор без делителя потока до 5 мкл пробы. Так как давление на входе в колонку регулируется очень точно, программирование давления выравнивает изменения, вызванные изменением окружающей температуры, и, тем самым, поддерживает установленные давления. Это позволяет получать точно воспроизводимое время удерживания. Кроме того предлагается возможность варьировать поток газа в ходе анализа таким образом, что дополнительно к программированию температуры может происходить программирование давления. Это обеспечивает сокращение времени удерживания и более узкие профили элюирования высококипящих компонентов или снижение необходимой температуры колонки.

Электронное регулирование давления может служить также для управления потоком газа в детекторе (выгодно для чувствительных к потоку детекторов АФД, ДЭЗ, ДТП, ПИД, МСД). При этом дополнительный газ для чувствительного к потоку детектора устанавливается таким образом, чтобы общий поток всегда оставался постоянным. Это позволяет в итоге оптимизировать чувствительность детектора и дает лучшую стабильность базовой линии. Программирование давления в ходе анализа может помочь предотвращению тушения пламени в ПИД большими потоками растворителя или уменьшать газовый поток через ПИД, чтобы экономить газ.

Кроме того, может использоваться электронное программирование давления для управления потоком газа на выходе из делителя. Это может быть сделано либо как простое и воспроизводимое задание величины, либо как запрограммированное по времени изменение распределения потоков на делителе для того, чтобы, например, уменьшить потоки после введения пробы и, тем самым, снизить затраты на высокоочищенный газ-носитель.

3.14.2.4. Многомерная колоночная техника

Несколько колонок можно соединить либо параллельно, либо последовательно: синхронный ввод пробы на две параллельные колонки, заметно отличающиеся по полярности (в большинстве случаев это слабо-полярная и средне-полярная колонки), одновременно дает два набора данных с разными временами удерживания и, в большинстве случаев, также с разной последовательностью выхода компонентов. Это дает аналитику большую уверенность в качественных и количественных результатах (подтверждающий анализ).

Последовательно соединенные колонки в сочетании с переключением колонок уже давно используются в промышленной ГХ, чтобы выполнить требования к времени проведения анализа, обнаружению следовых компонентов, правильности и воспроизводимости анализа. После того как принципы многоколоночной хроматографии были распространены и на капиллярные колонки, на рынке появились лабораторные приборы, специально сконструированные для этой цели, с которыми можно селективно перенести пик из избранной группы пиков на вторую колонку (техника вырезания пиков) или реализовать другие методы сочетания колонок. Так называемая «селективная настройка» является элегантным методом, чтобы целенаправленно варьировать «смешанную» полярность системы, состоящей из двух соединенных колонок, «пневматически», за счет изменения скорости потока в отдельной колонке путем изменения давления в точке соединения.

Хотя громадный потенциал «многомерной» ГХ вновь и вновь демонстрируется и пропагандируется на примере впечатляющих разделений, число пользователей метода, из-за связанных с ним больших затрат, увеличивается медленно. Многомерная ГХ оказывается необходимой при определении таких соединений в очень сложных по составу смесях, которые нельзя совсем или только очень неполно можно разделить с помощью ГХ/МС, как, например, изомеры и энантиомеры [3.87]. Поэтому она прочно закрепилась в таких видах лабораторного анализа, как, например, разделение стереоизомеров душистых и ароматических веществ на сочлененных ахиральных и хиральных капиллярных колонках. Автоматизированные ГХ приборы для многомерной хроматографии будут играть все возрастающую роль, поскольку позволяют экономить время при высокоэффективных и селективных разделениях веществ в сложных смесях и, особенно, в производственном анализе.

3.14.2.5. Детектирование/методы гибридизации

Самые новые детекторные разработки, предназначенные для диагностики запахов и ароматов, пытаются подражать человеческому носу. Пьезоэлектрические кварцевые сенсоры или сенсоры на основе проводящих полимеров дают в итоге спектр сиг-



нала, который характерен для определенного запаха. В обоих случаях для распознавания спектра запаха используются компьютерные методы (нейронные сети) [3.88].

Менее известна нелинейность детекторов. Даже ПИД и ДЭЗ новейшей конструкции еще проявляют это свойство. Подключенный персональный компьютер в состоянии прямо записывать исходные аналитические данные и исправлять полученные количественные данные в соответствии с нелинейностью детектора. Тогда «искривленная прямая» больше не вносит уже никаких ошибок. Программа персонального компьютера позволяет достигнуть оптимального соотношения сигнал/шум для детектора. Небольшие электронно управляемые клапаны изменяют потоки горючего газа и дополнительного газа до тех пор, пока ПИД или какой-то другой детектор не начнет работать в оптимальном режиме.

Больших успехов достигло сочетание хроматографии со спектроскопическими методами, которые позволяют получать информацию о структуре разделенных веществ («идентифицирующая детектирование»). Широчайшее распространение нашла комбинация КГХ-МС, которая как в смысле пределов обнаружения, так и качественной и количественной оценки превратилась в наиболее мощный метод анализа для летучих смесей. По количеству вещества, необходимого для анализа, и временных характеристик современная МС совместима с КГХ. Вместо необходимого для набивных колонок деления потока соединение капиллярных колонок с МС происходит либо посредством прямого, либо открытого интерфейса.

Для комбинации ГХ/МС принципиально следует различать два направления: с одной стороны, приборы с низким разрешением, работающие по принципу квадрупольной или ионной ловушки, которые дают разделение во всем диапазоне массовых чисел. Так как при ионизации электронным ударом (ЭУ) с энергией 70 эВ практически все соединения ионизируются, то работа МС в режиме ЭУ со сканированием (массовый поток) соответствует универсальному ионному детектору. Отображение суммарных ионных интенсивностей во времени дает в итоге хроматограмму общего ионного тока (англ.: TIS, Total ion current), которая соответствует хроматограмме с ПИД.

Все полученные в процессе хроматографии масс-спектры сохраняются. Для идентификации существуют поисковые алгоритмы, которые позволяют быстрое сравнение записанных спектров со спектрами, записанными в библиотеках. С другой стороны, регистрация одного или нескольких характеристических ионов в режиме индивидуального мониторинга (англ.: SIM, Selected ion monitoring) дает уникальную возможность настройки селективности при увеличенной чувствительности (массселективная детекция).

Для некоторых классов соединений химическая ионизация (ХИ) как техника мягкой ионизации позволяет получать не только молекулярные ионы и ионы аддуктов, которые легче интерпретировать, но и до некоторой степени повышать чувствительность и селективность. Хотя возможности МСД приборов возрастают, они тем не менее стали меньше и дешевле и в конце концов достигли размеров ГХ прибора. Тенденция в этой области приборостроения направлена на создание еще более экономичных и дружественных к пользователю систем с просто обслуживаемым программным обеспечением, функциями самодиагнос-

тики, сервисными и учебными программами, чтобы позволить внедрить МС как идентифицирующий и масс-селективный детектор в еще большем количестве лабораторий.

Другое, технически более затратное направление — это комбинирование ГХ высокого разрешения с масс-спектрометрами высокого разрешения (ВРГХ/ВРМС), как это необходимо, например, для анализа диоксинов, или с разделительными системами — (ГХ/МС/МС) в различных вариантах для структурного анализа смесей.

Гибрид ГХ/ИК-Фурье дает сведения о структуре комплементарные данным ГХ/МС, в частности, относительно вида и позиции функциональных групп, связи колец, цистрансизомерии. Этот метод по сравнению с ГХ/МС требует большего количества вещества, что затрудняет его использование при установлении структуры следовых и близких к ним количеств компонентов в сложных смесях, особенно если отнесение проводится по слабоинтенсивным полосам поглощения.

Из различных вариантов комбинации ГХ/ИК победило ИК-Фурье детектирование в газовой фазе. Приборы с конденсацией разделенных соединений (матричное выделение, криоловушки) больше не продаются. В качестве проточной кюветы используется позолоченная внутри стеклянная трубка (световод, англ.: light pipe) длиной от 12 до 20 см, которая обеспечивает многократное отражение ИК излучения. По аналогии с гибридом ГХ-МС результаты можно получать в виде хроматограммы общего сигнала (англ.: TRC, Total-response-Chromatogram) или хроматограммы на выбранной длине волны (англ.: SWC, Selectedwavelength-Chromatogram). Для идентификации соединений можно сравнить ИК спектры, полученные для каждого пика, с библиотеками спектров. Библиотеки ИК спектров газовых фаз постоянно расширяются. Так как ИК спектроскопия — это неdestructивный метод, элюат после ИК анализа можно направить в МС (ГХ/ИК-Фурье/МС).

Комбинация ГХ с атомно-эмиссионной спектроскопией открывает ряд новых возможностей. В атомно-эмиссионном детекторе (АЭД) выходящие из колонки вещества разлагаются на элементы в индуцированной микроволновой плазме, и возбужденные атомы излучают свет. Для измерения испускаемого света используется спектрометр с подвижной фотодиодной линейкой, который можно настраивать на определенную область спектра. При однократном вводе пробы можно определять до четырех элементов одновременно. При последующем вводе пробы и измененном положении фотодиодной линейки можно определить другие элементы.

В принципе, АЭД позволяет определить в летучих соединениях все элементы, кроме гелия. С помощью подходящих стандартов при соблюдении определенных граничных условий можно определять количественное соотношение элементов и, таким образом, находить бруттоформулу элюированных соединений. Таким образом, структурные данные, полученные из МС и АЭД, дополняют друг друга. Вследствие высоких расходов на приобретение и эксплуатацию приборов, комбинация ГХ-АЭД в настоящее время еще мало распространена.

Вероятно, в будущем появится еще спектрометрия ионной подвижности (англ.: IMS), в которой ионы будут перемещаться и детектироваться не в вакууме, как в масс-спектрометрии, а в газе при атмосферном давлении. Этот еще молодой спектроскопический метод разделения основан на различии, возникающем из-за спе-

цифической подвижности ионов, когда они проходят определенный отрезок при нормальном давлении и нормальной температуре. Наряду с возможностью комбинирования с ГХ преимуществами этого «электрофореза» в газовой фазе являются работа при нормальном давлении, незначительная занимаемая площадь, быстрота и низкая цена. Этот метод, как кажется, переходит из стадии развития к практическим приложениям.

Возможно, существенное более широкое развитие могло бы получить комбинирование ВЭЖХ и ГХ, причем ВЭЖХ служит для очистки или предварительного разделения ГХ аналитов. ВЭЖХ является самыми эффективными методом пробоподготовки, и систему можно легко автоматизировать (включая присоединение к ГХ). ВЭЖХ-ГХ привлекателен для следового анализа в сложных смесях, где нужно проанализировать единственное вещество или группу соединений, которая будет элюироваться с ВЭЖХ колонки узкой зоной.

Комбинация ВЭЖХ-ГХ была бы использована гораздо раньше, если бы фракции ВЭЖХ не были бы в 100–1000 раз больше, чем классические объемы проб для ГХ. С введением капиллярной ВЭЖХ, объемы фракций которой составляют меньше 50 мкл, эта проблема отпадает. Комбинация ВЭЖХ-ГХ уже зарекомендовала себя для ряда приложений.

3.14.2.6. Программное обеспечение

Последним этапом полного газохроматографического анализа являются регистрация, обработка и оценка полученных сигналов, то есть хроматограммы. В конце хроматографии аналитику или его заказчику должен быть предоставлен результат, который дает надежную и исчерпывающую информацию об аналитической проблеме. К системе обработке данных в ГХ высокого разрешения предъявляют особые требования, во-первых, к скорости преобразования данных в АЦП, так как на хроматограммах, полученных на капиллярных колонках, пики появляются очень быстро, во-вторых, из-за большого числа пиков (до 500 и более), которые могут встречаться на газовых хроматограммах сложных смесей. Для таких больших объемов данных необходим большой объем памяти, если нужно сохранять полную, неурезанную, оцифрованную хроматограмму (сохранение «сырых» результатов). Такое накопление «сырых» данных является условием для современной, интерактивной обработки данных, которая по надежности результата анализов (например, контроля обнаружения пика, формы пика, проведение базовой линии) заметно превосходит использовавшиеся ранее простые методы обработки. Равным образом, ГХ анализ не нужно проводить заново, если однажды сохраненная хроматограмма может быть использована неограниченное число раз с новыми параметрами и для несколько измененной постановки вопроса.

Как уже говорилось, бурное развитие микроэлектроники внесло большой вклад в развитие приборостроения. Наряду с управлением параметрами работы прибора в центре внимания находятся управление и автоматизация проведения анализов с удобной для пользователя подготовкой, обработкой и документацией данных. Системы контроля качества предъявляют новые требования к определению достоверности метода (включая программное обеспечение), калибровке системы и документации данных. Подключение к компьютерным сетям (LIMS, си-

стема лабораторной информации и управления) также приобретает заметное значение, как, например, удаленный опрос из сервисного центра через модем при поиске неисправностей.

Другим аспектом являются учебные и сервисные программы: вследствие чрезмерного объема издержек рутинная аналитика во все большей степени проводится все менее квалифицированным и менее опытным персоналом. Обучение может проводиться с помощью учебных видео- и интерактивных, компьютерных обучающих программ, описывающих основы метода или практический опыт и практическую работу.

Для разработки методов также появятся компьютерные программы, которые посредством симулирования хроматографического разделения помогут понять влияние изменения тех или иных параметров на результаты разделения, время анализа и т.д. и позволят проводить оптимизацию параметров. Таким образом, можно, например, из величин, полученных в двух тестах при разной скорости нагрева, определить оптимальные параметры анализа при программировании температуры.

3.14.2.7. Миниатюризация

Капиллярная ГХ – это вариант ГХ в уменьшенных размерах. Ее высокие эффективности – это результат систематической миниатюризации колонок и детекторов в течение прошедших 30 лет. Вызванная микроэлектроникой общая тенденция к миниатюризации влияет также на развитие КГХ. Уже в семидесятые годы группе из Стенфордского университета удавалось с помощью фотолитографической техники создать газовый хроматограф – капиллярную колонку длиной 1,5 м, крохотного дозирующего газ клапана, микроДТП, а также микрокомпьютера, вытравленного на кремниевой шайбе (кремневой пластинке) диаметром 5 см, которая была покрыта стеклянной шайбой.

Сегодня на рынке предлагаются маленькие ГХ приборы – карманные или в виде 19-дюймовых блоков, которые оснащены различными детекторами, электроникой, резервуарами для газа-носителя и газа-калибранта, персональным портативным компьютером и, частично, даже встроенными концентраторами [3.89]. Техника нанесения фазы для капиллярных колонок была заимствована из капиллярной СКФХ. Микромеханика позволяет конструирование и изготовление функциональных компонентов в уменьшенных размерах, которые требуются для таких узких колонок. Эти приборы уменьшенных размеров соответствуют требованиям быстрого анализа на месте события (полевой анализ), который приобретает все большее значение.

3.14.2.8. Полевой анализ

В анализе окружающей среды нужны устойчивые к помехам рабочие приборы для быстрой оценки (сенсоры) для стационарного или мобильного использования на месте отбора проб, которые или объединены в единую измерительную сеть (автоматические измерительные станции), или могут гибко подстраиваться к различным задачам. Последние устанавливаются в самолетах и поездах или используются в виде переносных приборов. Области их применения являются, например,

эмиссионный мониторинг, охрана труда, измерение фона внутренних помещений и утечек газа, переработка мусора и поиск полезных ископаемых в геологических экспедициях.

Благодаря высокой надежности современных коммерческих приборов предлагаются специальные конструкции для измерительных станций и лабораторий на колесах. Описанные выше миниатюрные системы для ГХ подходят в качестве переносных, не зависящих от источника энергии приборов, с которыми возможно быстрое проведение анализов непосредственно после отбора проб. Несколько фирмами предлагаются даже передвижные ГХ/МС системы [3.90].

ГЛАВА 4

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ (КОЛОНОЧНАЯ) ХРОМАТОГРАФИЯ

Высокоэффективная жидкостная (колоночная) хроматография (ВЭЖХ) занимает прочные позиции как высокоточный метод количественного и качественного анализа растворимых веществ с помощью хроматографии, причем подвижная фаза является жидкостью. Это хроматография высокого разрешения, также как и газовая. Самое важное различие состоит в том, что для газовой хроматографии в расчет принимаются только вещества, которые обладают достаточной летучестью, или могут быть переведены в пар без разложения при высоких температурах, или для которых можно воспроизводимо получать летучие производные. Условием жидкостной хроматографии является растворимость образца в каком-либо растворителе. За исключением сшитых высокомолекулярных соединений это требование выполняется для всех органических и ионных неорганических соединений. Фундаментальная теория газовой хроматографии, развитая в 60-х годах, которая привела к развитию капиллярных колонок, указывает также и для жидкостной хроматографии на взаимосвязь между высокой разделяющей способностью и физико-химическими параметрами.

ВЭЖХ является, таким образом, аналитическим методом разделения смеси веществ, растворимых в жидкости и применимой также для препаративного разделения веществ. Смесь веществ, подходящая для ВЭЖХ, должна полностью растворяться в одном и сорбироваться на другом из двух хроматографических вспомогательных веществ: подвижной и стационарной фазах. Подвижная и стационарная фазы не должны химически взаимодействовать друг с другом, а также и с образцом. В противоположность обычной колоночной хроматографии, при которой образец, растворенный в подвижной фазе, перемещается сквозь стационарную фазу под действием силы тяжести или небольшого давления, при ВЭЖХ подвижная фаза под высоким давлением прокачивается через колонку со стационарной фазой.

По сравнению с газовой хроматографией, применение которой невозможно для нелетучих или термически нестабильных соединений, у жидкостной хроматографии есть одно-единственное условие, которое требует, чтобы проба была растворима в какой-либо жидкости. Следующее отличие состоит в том, что в газовой хроматографии преодолеть проблемы разделения можно, только заменив стационарную фазу, в то время как в ВЭЖХ разделение пары соединений зависит как от стационарной, так и от подвижной фазы.

Газы и пары также растворяются в жидкости. Однако так как газовая хроматография по сравнению с жидкостной — более быстрый, лучший, более чувствительный, точный и более дешевый метод, который позволяет разделять и анализировать испаряемые без разложения или же воспроизводимо разрушаемые



соединения, то разделение таких смесей лучше оставить для ГХ, особенно если значение придается разделяющей способности.

В начале в жидкостной хроматографии для перемещения подвижной фазы использовали силу тяжести, то есть гидростатическое давление элюэнта продавливало его через слой сорбента в разделительной колонки. Сорбент был грубого зёрнения, а скорости потоков были умеренными. Так как при таком подходе колонки работали вне оптимальных условий диаграммы Ван-Деемтера, ширина пиков была значительной. Авторы современной хроматографии, Мартин и Синдж, уже в 1941 году предоставили теоретическое обоснование того, что для эффективного хроматографирования в жидкой фазе необходимы

- очень мелкое зёрнение стационарной фазы и, соответственно,
- более высокое давление для прокачивания подвижной фазы.

Для перемещения подвижной фазы необходимы насосы высокого давления. На основании этого кое-где ошибочно понимают ВЭЖХ как жидкостную хроматографию высокого давления. ВЭЖХ, однако, следует понимать исключительно в аспекте высокого разрешения. Высокое давление не имеет ничего общего с высоким разрешением. Если для решения проблемы разделения не требуется высокой разрешающей способности, то можно применить более дешёвую жидкостную хроматографию низкого давления. Все компоненты хроматографии низкого давления выполнены для работы при низких давлениях и, соответственно, дешевле. Движение подвижной фазы осуществляется, таким образом, с помощью более простых насосов низкого давления или просто под давлением газа из баллона с азотом.

Самое активное развитие среди аналитических методов разделения наблюдается все еще в области жидкостной хроматографии, хотя ее коммерциализация произошла уже два десятилетия назад. Между тем ВЭЖХ занимает начальную позицию среди аналитических методов, и несмотря на это ее ежегодный уровень прироста составляет около 15%! Причиной возрождения колоночной хроматографии послужило, во-первых, развитие высокочувствительных детекторов для определения веществ в элюате разделительной колонки, а, во-вторых, перенос теоретических основ газовой хроматографии на жидкостную хроматографию.

Резкий рост популярности ВЭЖХ произошел также благодаря внедрению обращенных фаз, которые позволили непосредственно вводить и элюировать водные растворы проб. Таким образом, было облегчено внедрение ВЭЖХ в химию, которая работает в водных средах.

Промежуточное положение между ГХ и ЖХ занимает сверхкритическая флюидная хроматография (СКФХ). В этом методе преимущество ГХ (универсальность, чувствительные детекторы, например ПИД) сочетается с достоинствами ЖХ (растворимость пробы в элюэнте, разделение при низких температурах).

Стремительное развитие микропроцессоров и компьютера и их применение к управлению и контролю открыло новые возможности для конструирования и производства хроматографической аппаратуры и сбора данных. В настоящее время на рынке присутствуют два принципиально разных типа устройств: компактные конструкции, в которых все без исключения составные элементы интегриро-

ваны в одном приборе и управляются одним процессором. С точки зрения обслуживания это является оптимальным решением, хотя, конечно, есть опасность, что, если сломается хотя бы один компонент, вся система полностью выйдет из строя. Для начинающих работать в области хроматографии такие приборы удобны тем, что они не требуют никаких предварительных знаний и все компоненты уже оптимально собраны в едином приборе.

Благодаря ПК упростилась связь отдельных элементов прибора между собой. Поэтому модульный тип прибора получает все большее распространение. Из подходящих комплектующих можно собирать прибор индивидуальной оптимальной конфигурации, в котором могут сосуществовать компоненты различных производителей. Можно предвидеть, что в ближайшем будущем на рынке появятся приборы следующего поколения, которые смогут полностью автоматически оптимизировать разделение, проанализировать пробы в различных условиях и на основании хроматографических данных оптимизировать весь процесс.

Современная жидкостная хроматография предъявляет высокие требования к приборам. Быстрые анализы на коротких колонках, заполненных маленькими частицами, возможны, только если поток при высоком давлении подается без пульсаций. Стабильность потока необходима, чтобы понизить шумы детекторов. Только при постоянном потоке можно с обычными, чувствительными к концентрациям детекторами проводить точные количественные анализы. Система в целом, особенно от устройства ввода пробы до выхода из детектора, должна быть оптимизирована так, чтобы повторное перемешивание разделенных зон вследствие дисперсии было бы по возможности наименьшим. Новые разработки — особенно микроколонок — ставят существенно более высокие требования к приборам, даже с подгонкой ввода пробы или соединительных деталей (по возможности без мертвых объемов), чувствительная детекция с фотометрическими детекторами из-за слишком больших объемов ячейки кажется едва ли возможной.

Химические свойства используемых элюентов и необходимых для оптимизации разделения добавок предъявляют высокие требования к коррозионной устойчивости элементов, используемых в конструкции. В конечном итоге, четыре тенденции определяют дальнейшее развитие рынка приборов.

БОЛЕЕ ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Для достижения более высокой эффективности колонки заполняют более мелкими частицами. Размер зерна составляет обычно 5 мкм, а в последнее время используются также частицы размером 3 мкм. Это предполагает, что придется мириться с более высоким перепадом давлений, чтобы поддерживать соответствующую скорость потока элюента. Частицы меньшего размера позволяют достичь необходимого разрешения на более коротких колонках. Для эксплуатации с оптимальной скоростью потока колонки, заполненной частицами 3 мкм, следует поддерживать величину давления не ниже 10 бар на каждый сантиметр длины колонки. Соответствующее мертвое время составляет 10 с на сантиметр колонки. При этих условиях на каждый сантиметр длины колонки приходится 1500 теоретических тарелок. Для частиц 5 мкм соответствующие величины составляют около 2,5 бар на 1 см; 17 с на 1 см и 1000 теоретических тарелок на 1 см.

БЫСТРЫЕ АНАЛИЗЫ

Конечно, возникает желание сделать ЖХ анализы более быстрыми. Это означает работу с потоком, превышающим оптимальный предел для соответствующей колонки. Следствием этого является более высокое давление, которое должно прикладываться к колонке. Для элюирования неудерживаемого вещества за 10 с наиболее часто используемыми метанольно-водными смесями на колонке длиной 10 см, заполненной частицами 3 мкм, необходим перепад давлений в 1000 бар.

ЭКОНОМИЯ ЭЛЮЭНТОВ

Дорогие элюэнты, трудная и дорогостоящая утилизация отходов, малые количества анализируемых веществ, а также желание совместить жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию вернули в практику тонкие колонки с внутренним диаметром от 0,5 до 2 мм вместо обычных 4,6 мм. Скорость потока в таких тонких колонках (1 мм) при той же эффективности разделения в 20 раз меньше. Это означает, что обычная для стандартной аналитической колонки скорость потока 1 мл/мин уменьшается до 50 мкл/мин для колонки диаметром 1 мм.

ТРЕХ- И ЧЕТЫРЕХКОМПОНЕНТНЫЕ ГРАДИЕНТЫ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Трудные проблемы разделения, которые для обращеннофазовых систем не могут быть решены с обычными двухкомпонентными смесями, привели к применению трех- и даже четырехкомпонентных систем элюентов. Поэтому необходимо не только быстро менять элюэнты от одного анализа к другому, но и для каждого подбирать подходящую комбинацию, включая трех- или четырехкомпонентные смеси.

4.1. ВЭЖХ оборудование

Основными составляющими оборудования для ВЭЖХ являются система ввода пробы, насос высокого давления для прокачивания подвижной фазы, хроматографическая колонка, которая соединена капилляром с проточным детектором, а также необходимый для качественного и количественного анализа самописец или электронный интегратор. Соответственно этим частям прибора автоматически протекают отдельные этапы хроматографического анализа:

- ввод пробы,
- разделение,
- детектирование,
- количественная обработка данных.

Конструкция и составные части любого ВЭЖХ прибора не зависят от того, какой используется принцип разделения. Обычные приборы, в принципе, оснащены для аналитических задач, но позволяют проводить также и микропрепаративные работы. Путем замены головки насос можно просто перестроить на препаративную хроматографию. Но больший диаметр поршня означает меньшее предельное давление насоса. Преимуществом модульного оборудования является то, что из отдельных комплектующих можно собрать оптимальный прибор, удовлетворяющий конкретным потребностям [4.1].

Очень хорошая воспроизводимость разделения для качественного анализа (по временам удерживания) и для количественного анализа (расчет по площади или высоте пиков) предъявляет высокие требования к производительности и коррозионной устойчивости отдельных комплектующих [4.2]. Высокая разделяющая способность колонки стоит немного, если после колонки происходит значительное размывание пика. Комплектующие с малыми мертвыми объемами и соответствующие используемому потоку отвечают за то, чтобы разделение, достигнутое в колонке, не было сведено на нет уширением пиков.

Так как физическое разделение веществ в ВЭЖХ колонке определяется изотермой сорбции, то разделяющая способность колонки прямо зависит от температуры. Практически все физические феномены хроматографии, такие как сорбционное равновесие, диссоциация, растворимость и вязкость зависят от температуры, и их действие следует рассматривать как аддитивную величину. Поэтому для достижения хорошей воспроизводимости результатов необходима очень стабильная температура колонки. Для этого используются колоночные термостаты, постоянная температура в которых поддерживается либо с помощью водяной бани, либо за счет электрически нагреваемого алюминиевого блока, либо за счет циркуляции воздуха. С помощью микропроцессорных технологий можно достичь постоянства температуры $< 0,1$ °C [4.3].

4.2. Насосы для ВЭЖХ

Применяемая сегодня ВЭЖХ предъявляет высокие требования к системе насосов, особенно в отношении отсутствия пульсаций при подаче растворителя. Высокое давление около 150 бар необходимо для того, чтобы подвижную фазу можно было прокачивать с необходимой скоростью через хроматографическую колонку, поскольку мелкие частицы, которыми заполнена колонка, создают высокое сопротивление потоку. Насос высокого давления должен обеспечивать с высокой точностью постоянный и равномерный поток, с тем чтобы сделать возможным достоверный качественный анализ по объемам (или времени) удерживания и чувствительный количественный анализ без влияния пульсации на свойства детектора [4.4]. Пульсации проявляются в дрейфе базовой линии и в шумах детектора.

Для аналитической работы со стандартными колонками (с диаметром внутреннего сечения 4,6 мм) используемая скорость потока находится в пределах от 0,1 до 10 мл/мин. Часто выбирают стандартную скорость потока 2 мл/мин. Для препаративных работ необходимы более высокие скорости потока.

Насосы для ВЭЖХ являются той частью ВЭЖХ системы, которая подвергается наиболее высоким нагрузкам. Они должны работать стабильно продолжительное время и зачастую в трудных условиях, как, например, при контроле процессов, давать надежный, постоянный и воспроизводимый поток. Насос должен быть прост в обращении, это означает, например, что желаемая скорость потока устанавливается просто и воспроизводимо. Система подачи растворителя существенно влияет на количественный и качественный результаты ВЭЖХ анализа [4.5]. Регулируемое давление сверху и снизу предоставляет возможность оставлять работающий насос без наблюдения также и на ночь.



Пульсации прокачиваемого насосом потока очень часто выравнивают демпферами (например, мембранными демпферами, капиллярами демпферами). Наряду с такими механическими демпферами насосы более высокого класса содержат также и электронный демпфер пульсаций. Здесь речь идет о саморегулируемой системе, в которой колебания падения давления на встроенном «ограничительном капилляре», в свою очередь, регулируют частоту движения насоса и, таким образом, предотвращают пульсацию. В целом можно заключить, что постоянство потока, производимого насосом, прямо пропорционально цене и обратно пропорционально сроку эксплуатации насоса. Для точных количественных определений пульсации потока ни в коем случае не должны существенно превышать значение, равное 1%. Поэтому при определении времени удерживания и площади пиков важно, чтобы механические и электронные части, на которые пользователь не имеет никакого влияния, работали точно и воспроизводимо.

Принципиально различают насосы, работающие с постоянным давлением, и насосы, работающие с постоянным потоком. Современные ВЭЖХ насосы работают в режиме постоянного потока, это означает, что, независимо от возникшего падения давления в системе, скорость потока всегда поддерживается постоянной. Насосы с постоянным потоком можно в свою очередь разделить на периодические и непрерывные.

4.2.1. Шприцевые насосы периодического действия

Они работают как гигантский шприц: подвижный, медленно перемещающийся поршень вытесняет жидкость из резервуара, как показано на рис. 4.1. Подвижная фаза подается без пульсаций. Хорошие насосы дают давление до 400 бар и расход до 50 мл/мин. Недостаток таких насосов состоит в том, что резервуар после опустошения должен быть вновь заполнен подвижной фазой, но этот процесс можно автоматизировать. Если элюэнт приходится часто менять, например, при поиске оптимальных условий разделения, то частое опорожнение и заполнение резервуара утомительно. Прокладка между поршнем и цилиндром создает проблему при высоких давлениях, поэтому хорошие насосы вытеснения никогда не бывают дешевыми. Преимущество насосов этого типа состоит в том, что им не нужны вентили и поток растворителя без пульсаций подается с постоянной скоростью. Время подачи зависит от объема цилиндра, обычно это от 100 до 500 мл, и от величины потока.

Этот ранее распространенный тип насосов все больше и больше теряет свое значение, так как он не подходит для градиентного элюирования и только после относи-

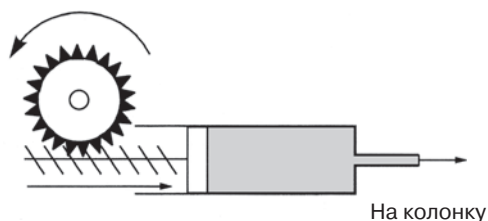


Рис. 4.1. Шприцевый насос периодического действия

тельно продолжительной паузы начинает подавать свободный от пульсаций поток подвижной фазы. В последнее время этот принцип снова находит больше применения при подаче элюэнта на узкие разделительные колонки (микроколонки) или в системах подачи элюэнта в сверхкритической флюидной хроматографии (СКФХ).

4.2.2. Насосы непрерывного действия

Преобладающее большинство современных насосов работает с постоянным потоком и непрерывно. Это значит, что фаза работы и подачи элюэнта постоянно сменяется фазой всасывания и наоборот. Насосы этого типа являются или поршневыми, или мембранными насосами. В обоих насосах подача элюэнта достигается периодическим движением поршня в прямом и обратном направлениях. Для предотвращения обратной подачи элюэнта чаще всего используется клапан с сапфировым шариком.

Скорость потока в случае мембранного насоса в отличие от поршневого насоса регулируется не по частоте, а по высоте подъема поршня. Недостаток такой системы в том, что скорость потока также зависит от противодействия системы. Мембранные насосы устойчивы по отношению к агрессивным подвижным средам, так как поршень и поршневая прокладка не контактируют с элюэнтom, что упрощает проблему уплотнения поршня и повышает надежность работы насоса. Дополнительная зависимость скорости потока от давления в системе требует высоких дополнительных затрат на измерение и регулировку потока. Поэтому эти насосы в настоящее время почти не используются.

Сегодня для подачи элюэнта используются исключительно насосы с коротким ходом поршня, у которых элюэнт вытесняется непосредственно поршнями. Этот метод предъявляет очень высокие требования к уплотнению поршня, и соответствующая прокладка должна рассматриваться как изнашиваемая деталь и время от времени подлежит замене. Поток в системах с насосами с коротким ходом поршня регулируют, изменяя частоту хода поршня сохраняя постоянной величину самого хода.

Преимущество однопоршневых насосов непрерывного действия заключается в легкости их промывки и меньшей стоимости по сравнению с многопоршневыми насосами той же производительности. Это особенно заметно, если принять во внимание, что клапаны надежны в работе только при надлежащем уходе. При циклическом движении одного-единственного поршня получается синусообразный профиль потока, причем половину времени элюэнт может и не прокачиваться, так как в это время поршень должен заполняться элюэнтom.

Так как такой пульсирующий поток для хроматографической работы совершенно не подходит, то устанавливают ассиметричные трансмиссионные шайбы, так называемые кулачки, применяемые для более быстрого заполнения головки насоса элюэнтom. В положении, показанном на рис. 4.2, поршень подает элюэнт. Он движется направо и вытесняет растворитель.

В положении P поршень, следуя за вогнутой формой эксцентрика, вернется обратно. Но уже через 200 мс поршень находится в положении P' и снова подает элюэнт.

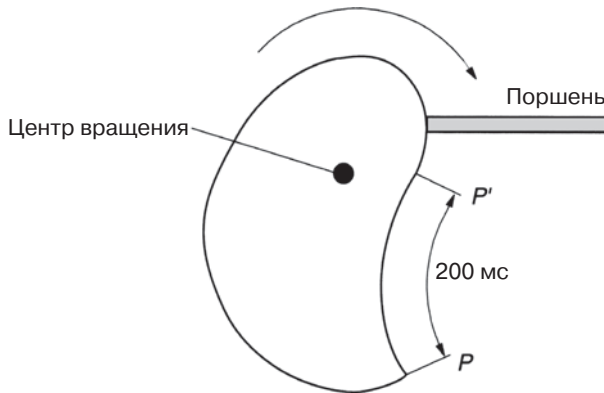


Рис. 4.2. Кулачковый механизм

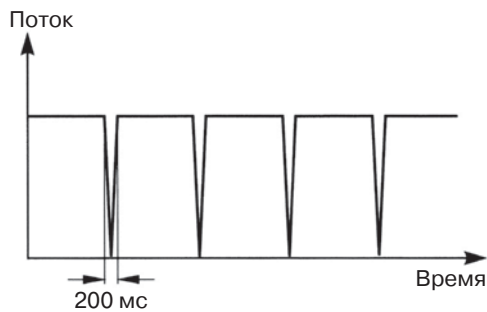


Рис. 4.3. Профиль потока однопоршневого насоса с коротким ходом поршня

Если при этом кулачок имеет форму архимедовой спирали, у которой радиус возрастает линейно с угловой фазой, пройденной кулачком, то во время подачи движение поршня создает постоянный поток элюента. Эксцентрик устроен так, что всасывающая фаза поршня, при которой поток прерывается, составляет только малую долю от фазы подачи элюента. Возникающий при этом профиль потока подвижной фазы представлен на рис. 4.3. Пульсации, возникающие при всасывании элюента, сглаживаются демпферами, устанавливаемыми за поршнем в нагнетательной линии насоса.

Лучше, но также и дороже применение насосов с двумя головками, которые соединены со смещением по фазе. При этом, в то время как одна головка насоса подает элюент, другая его всасывает (рис. 4.4). В таких двухпоршневых насосах также используют несимметричные эксцентрики, которые позволяют, при переходе подачи от одной головки к другой, избежать прерывания потока, которое возникает вследствие сжатия элюентов. Такая конструкция обеспечивает постоянную скорость движения поршня в рабочем цикле и тем самым постоянную скорость потока элюента без каких-либо максимумов, как это имеет место при синусоидной форме подачи элюента. Таким образом минимальные пульсации в двухпоршневой системе обеспечиваются использованием двух архимедовых спиралей, которые антипараллельно ориентированы и прецизионно отъюстированы

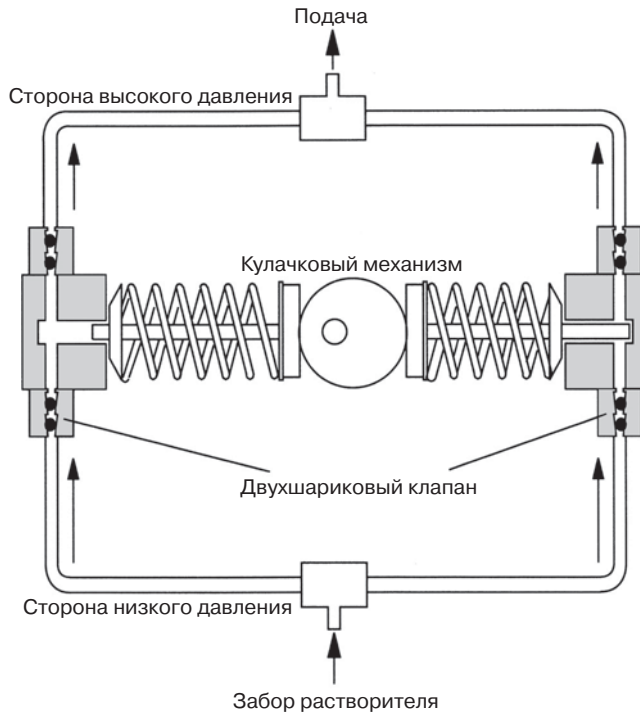


Рис. 4.4. Принцип работы двухпоршневого насоса с коротким ходом поршня

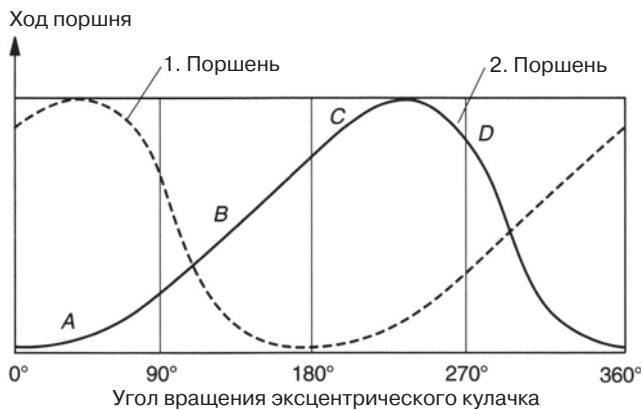


Рис. 4.5. Профиль движения поршней двухпоршневого насоса: А — ускорение; В — постоянное движение; С — задержка; D — заполнение цилиндра

цифровым методом. Рис. 4.5 показывает движения поршней двухпоршневого насоса. Механическая стабильность насосной системы обеспечивается сокращением числа подвижных частей, поскольку управляемый процессором шаговый мотор непосредственно связан с поршнями через кулачковый механизм.

Другой способом добиться постоянства потока заключается в использовании насоса, в котором два поршня, также работающих со смещением фаз, под-

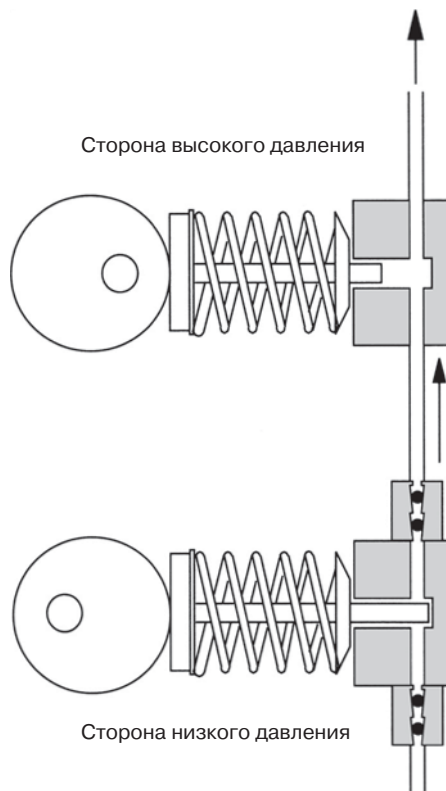


Рис. 4.6. Принцип действия последовательно подключенных насосов

ключаются один за другим. При этом клапанами входа и выхода снабжен только первый поршень. Объем элюента, вытесняемого вторым поршнем, составляет от половины до четверти объема, вытесняемого первым поршнем. Когда первый поршень всасывает элюент, второй, при закрытом выпускном клапане первого поршня, подает элюент в систему. Когда первая головка начинает подавать элюент, вторая работает на всасывание, так что только разностная потоков первого и второго поршней поступает в систему (рис. 4.6). Преимущество этого типа насосов заключается в экономии на клапанах входа и выхода для второго поршня, вследствие чего, наряду с ценой, должна уменьшаться также и вероятность поломок.

Эффективная дегазация подвижной фазы необходима для безупречного функционирования насосов высокого давления. Пузырьки газа в головках насосов или клапанных системах мешают равномерному потоку элюентов и даже могут его прервать. Пузырьки газа в ячейке детектора вызывают шум и ложные сигналы. При подаче подвижной фазы из емкости через насос/колонку к детектору может измениться степень насыщения подвижной фазы растворенными газами, и образуются газовые пузырьки. Обычные методы дегазации элюентов — это нагревание под вакуумом, обработка ультразвуком или вытеснение растворенных газов с помощью малорастворимого инертного газа гелия путем пропускания его

через фритту в емкости для элюента. Коммерчески доступны устройства дегазации, которые работают со специальными газопроницаемыми, но герметичными для жидкости мембранами [4.6].

4.3. Градиентное элюирование

Успешное разделение достигается путем изменения состава подвижной фазы. После выбора подходящей колонки и подвижной фазы, которая, как правило, представляет собой двухкомпонентную смесь из одного хорошего и другого менее хорошего растворителей, состав подвижной фазы варьируют таким образом, чтобы обеспечить, с одной стороны, полное разделение веществ, а, с другой стороны, не слишком длинное время анализов. Сложные пробы, которые содержат компоненты с широким спектром времен удерживания, требуют изменения условий элюирования во время анализа. Варьируя соотношения растворителей в элюенте, увеличивают элюирующую силу элюента во время анализа. Напротив, если работают в изократическом режиме, т.е. с постоянным составом элюента при получении хроматограммы, то возможно, что

- первые пики будут плохо разрешены,
- последние пики будут широкими и размытыми; они могут потеряться в шуме детектора.

Если используют только более слабый растворитель, то разрешение первых пиков улучшится, но, вместе с тем, последние, вероятно, совсем не будут элюированы. Если используют только более сильный растворитель, то он еще больше ухудшает разрешение первых пиков, так что уже нельзя будет определить отдель-

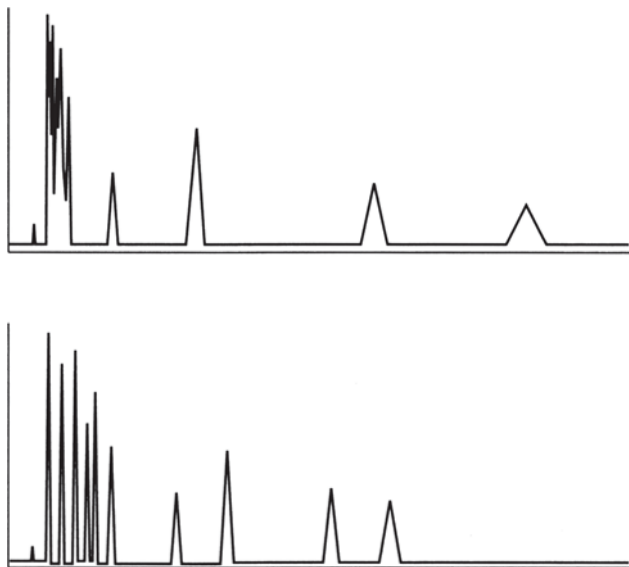


Рис. 4.7. Проблемы элюирования наверху: изократический режим внизу: с градиентом растворителя



ные компоненты. Это — основная проблема разделения (рис. 4.7). Для ее решения есть возможность провести хроматографию с градиентом растворителя. Этот метод позволяет растягивать на хроматограмме первые пики и сжимать последние за счет их более быстрого элюирования. Градиент растворителя должен выбираться таким образом, чтобы начальная подвижная фаза была способна элюировать самые быстрые пики. Позже состав должен измениться таким образом, чтобы хорошо элюировались сильноудерживаемые компоненты. Сила элюирования подвижной фазы должна возрастать во время анализа.

Использование градиентного элюирования в жидкостной хроматографии соответствует программированию температуры колонки в газовой хроматографии. В то время как в ГХ изменение подвижной фазы, т.е. газа-носителя, не оказывает никакого влияния на разделение, но на удерживание сорбатов отчетливо влияет температура колонки, в жидкостной хроматографии для этих факторов наблюдается противоположный эффект.

Примерно 90% всех систем ВЭЖХ, которые применяются для разработки методов и сложных разделений, — это градиентные системы. Принципиально их можно разделить на градиенты низкого и высокого давления. Все градиентные системы имеют целью либо смешивать растворители изократически — при этом можно легко подобрать соотношение растворителей, соответствующее данной аналитической проблеме, либо во время анализа изменять состав смеси растворителей для увеличения силы элюирования таким образом, чтобы добиться наилучшего разделения веществ.

Несмотря на то, что в первых приборах для ВЭЖХ градиентные системы были реализованы в виде сообщающихся сосудов, сегодня применяются только программируемые градиентные системы. Микропроцессор обеспечивает управление сложными задачами с незначительными финансовыми издержками и является поэтому неотъемлемой частью системы. По существу есть пять основных требований, которым должна удовлетворять современная градиентная система:

- приготовление смесей с точно заданным соотношением компонентов,
- незначительные колебания в соотношении компонентов смеси,
- короткое время отклика при задании изменения соотношения компонентов смеси,
- постоянная скорость потока и
- легкое обслуживание.

Часто упоминаемый термин «воспроизводимость» здесь сознательно не приводится. Воспроизводимость обеспечивается автоматически выполнением первых четырех основных требований. Для количественной оценки воспроизводимый состав смеси растворителей имеет большее значение, так как он существенно влияет на времена удержания. При количественном определении по высоте пиков эти величины могут значительно изменяться при одинаковых величинах площади пиков.

Изменение состава растворителей может происходить линейно, линейно с изменением наклона, с отклонением от линейности в положительную или отрицательную сторону. Несколько примеров формирования градиентов представлены

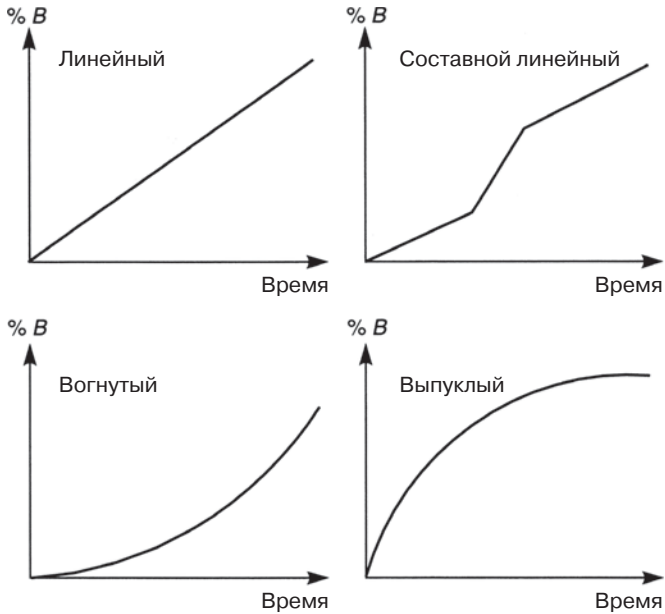


Рис. 4.8. Возможные режимы градиентного элюирования

на рис. 4.8. Очевидно, что следующие друг за другом растворители должны смешиваться между собой, и перед началом подачи новой пробы должно быть восстановлено исходное соотношение отдельных растворителей в смеси.

В некоторых случаях можно достичь удовлетворительной воспроизводимости также без соблюдения вышеупомянутых критериев, если разделение компонентов пробы не представляет проблемы. В любом случае, указание воспроизводимости применимо всегда только для соответствующих тестовых условий. Важно создать общие предпосылки для воспроизводимости результатов анализов, причем следует уделять внимание «правильному смешению» с учетом уменьшения объема смеси растворителей и постоянству потока элюента с учетом сжимаемости смеси растворителей. Дополнительно должны быть решены, конечно, проблемы дегазации растворителей, а также приборного оформления.

Градиентные системы низкого и высокого давления появились сначала как обычная вынужденная мера. Первая программируемая градиентная система была сделана как дополнение к изократической системе ВЭЖХ с одним насосом высокого давления и устройством управления.

Разработка градиентной системы высокого давления требовала только незначительных дополнительных затрат. При этом высокие аппаратные издержки градиента высокого давления способствовали развитию системы градиента низкого давления. К всасывающей линии уже имеющегося насоса высокого давления подключались два или три клапана для переключения растворителей, чей такт и определял соотношение компонентов смеси. Таким образом, можно было смешивать до трех растворителей с относительно небольшими затратами на оборудование.

4.3.1. Градиент низкого давления

При градиенте низкого давления компоненты элюента смешиваются на стороне низкого давления за счет магнитных клапанов с временным управлением или различных прецизионных насосов низкого давления, чтобы затем подаваться в систему насосом высокого давления. Рис. 4.9 показывает блок-схему системы тройной градиента низкого давления. На всасывающей части насоса высокого давления находится камера смешения, которая через три магнитных клапана связана с тремя емкостями для растворителей А, В и С. Преимуществом данной тройной градиентной системы являются, в частности, относительно невысокие затраты на оборудование.

Примечательно то, что эта система позволяет поддерживать постоянную скорость потока при условии, что насос располагает автоматическим устройством для компенсации сжимаемости элюента или другим подходящим устройством для поддержания постоянного потока. Так как величина потока зависит в первую очередь от переменных коэффициентов сжимаемости смеси растворителей, то естественно имеет смысл поддерживать постоянную скорость потока с помощью автоматической обратной связи с датчиком сжимаемости.

Объем системы создания градиента должен быть настолько небольшим, насколько это возможно, чтобы избежать диффузионного искажения градиента. В простейшем случае используют различные емкости для разных составов элюентов, в которые одну за другой помещают всасывающую линию насоса высокого давления. Более элегантно переключение с помощью магнитного клапана, который к тому же может управляться автоматически. Клапаны открываются на различную величину подачи или на различное время, вследствие чего изменяется состав элюента в камере смешения.

Существенный недостаток системы с градиентом пониженного давления состоит в том, что всасывающая фаза насоса высокого давления не может быть од-

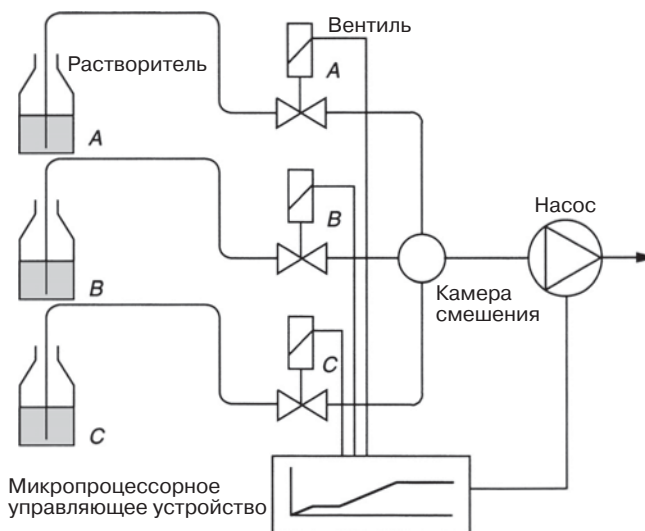


Рис. 4.9. Тройная градиентная система низкого давления

нозначно определена, так как фактически начало всасывания зависит от сжимаемости растворителя и давления на колонке. Если поршень механически начинает фазу всасывания, то объем элюента, присутствующего в цилиндре насосов при атмосферном давлении, расширится и замедлит фактическое начало всасывающей фазы. Вместе с тем это обстоятельство создает принципиальную проблему для синхронизации фазы всасывания и времени переключения магнитных клапанов. Если, например, нужно подать 5% растворителя А, то возможно, что всасывающий поток в период всасывания первых 5% вовсе не эффективен и, таким образом, растворитель А не попадает в камеру смешения. Тем не менее, с помощью специальных приемов можно дозировать компоненты с минимальными процентными долями в желаемых процентных соотношениях. Другая возможность заключается в том, чтобы сместить время короткого включения магнитных клапанов на конец фазы всасывания. В обоих случаях нерегулярности потока должны сглаживаться с помощью увеличенной камеры смешения.

Неконтролируемый забор компонентов растворителя вызывает также сжатие объема при смешивании. Если вначале в камеру смешения забирается растворитель А, то скорость потока А согласуется со скоростью забора. Если теперь добавляется компонент В, то скорость его потока возрастает в соответствии с тем, как сжимается объем смеси.

Теоретически соотношение компонентов в смеси определяет время включения клапанов, управляющих подачей растворителей, так как, однако, по вышеупомянутым причинам скорости потоков в линиях подачи могут меняться, то соотношение компонентов смеси на выходе насоса высокого давления всегда отклоняется от заданного значения. Рис. 4.10 показывает типичный ход состава градиентной смеси в зависимости от заданного значения. Чтобы сгладить неизбежные флуктуации состава смеси, в этих системах необходимы камеры смешения больших объемов (до 4 мл), чем в системах градиента высокого давления. В большинстве случаев камеры смешения устанавливают одновременно и на стороне низко-



Рис. 4.10. Типичные отклонения экспериментальных значений от заданных величин в градиентной системе низкого давления

го давления, и на стороне высокого давления. Это, естественно, значительно увеличивает время, когда градиент достигнет колонки.

У систем низкого давления есть то преимущество, что можно присоединить сколь угодно много емкостей для растворителей и, как результат, полярность мобильной фазы при градиенте можно менять в широких пределах. Кроме того, они относительно дешевы.

4.3.2. Градиент высокого давления

Системы градиента высокого давления дороже, но, благодаря высокоразвитой электронике, они просты в работе, очень гибки и легко автоматизируемы. Для каждого растворителя нужен отдельный насос высокого давления, то есть для бинарной градиентной системы необходимы два насоса высокого давления. Сначала основной (или даже весь) поток создает насос со слабым элюентом, а насос с сильным элюентом добавляет лишь немного или вовсе ничего. Доля потока от каждого насосов в суммарном потоке может меняться плавно или ступенчато, линейно или экспоненциально. Электронное управление должно следить за тем, чтобы суммарный поток, создаваемый двумя насосами, оставался постоянным.

Камера смешения, расположенная за насосами, должна быть маленького объема, не должна иметь мертвых углов и должна обеспечивать полное смешение обоих компонентов. Так как две жидкости под высоким давлением плохо смешиваются друг с другом, то в камеру смешения помещают маленький генератор ультразвука, который способствует быстрому и тщательному смешиванию обоих растворителей.

Рис. 4.11 показывает принципиальную схему бинарной системы градиента высокого давления. Преимущества системы — это короткое время отклика при

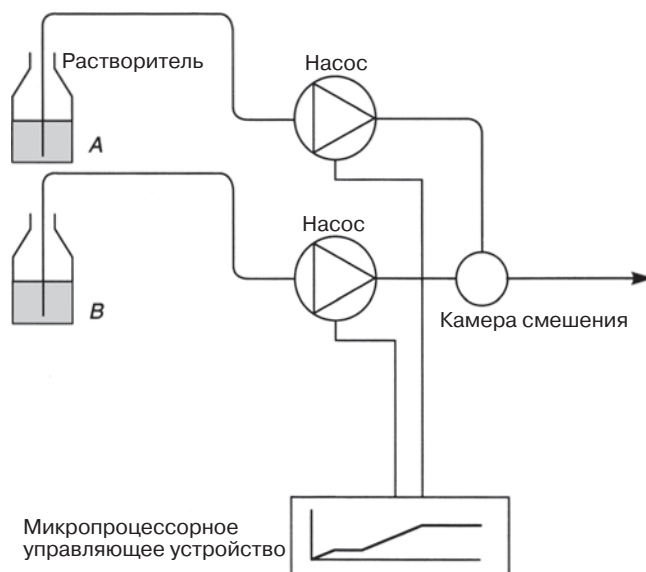


Рис. 4.11. Бинарная градиентная система высокого давления

скачкообразной форме градиента и получение смеси точного состава. Недостатками являются: высокие затраты на оборудование, особенно для тройных градиентов, недостаточная точность смешивания при низких скоростях потока и низком содержании компонентов в смеси, а также изменение скорости потока в зависимости от сжимаемости смеси растворителей.

Насосы с малым ходом поршня часто показывают неудовлетворительное постоянство потока в области скоростей от 0 до 0,1 мл в минуту. При этом соблюдение точного числа оборотов привода не представляет проблемы. Основная причина непостоянства потока — это протекание клапанов насоса, которое трудно избежать на практике. Периодическая или импульсная работа насоса при подаче малых количеств растворителя, в случае его малой процентной доли в смеси, не может решить эту проблему, так как, естественно, что даже если насос не подает растворитель, его клапаны находятся под рабочим давлением, создаваемым вторым насосом. Поэтому небольшая часть объема, поданного первым насосом, в паузах между фазами подачи вытесняется обратно в цилиндр первого насоса.

Следующий фактор, который влияет на постоянство или непостоянство градиента, обусловлен постоянной пульсацией потока. Относительная величина пульсации возрастает с уменьшением скорости потока, и отрицательное влияние этого эффекта может компенсироваться только увеличением камеры смешения. Это противоречит требованию короткого времени отклика для градиента. На практике объем камеры смешения не может быть значительно меньше 2 мл, причем пульсация градиента возрастает с уменьшением скорости потока.

Очень существенный недостаток градиента высокого давления связан с тем, что при смешивании постоянных объемов растворителей А и В происходит уменьшение объема и реальная скорость потока больше не соответствует заданной скорости. Это сжатие объема зависит от соотношения компонентов в смеси и, следовательно, также от ранее упомянутых пульсации и скорости утечки через клапаны насосов. Тем не менее, колебания скорости потока очень мешают при интегрировании площадей пиков. На рис. 4.12 представлена типичная зависимость

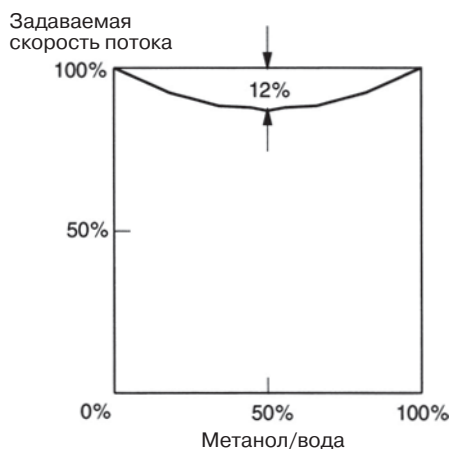


Рис. 4.12. Зависимость скорости потока от соотношения компонентов смеси

скорости потока от соотношения компонентов смеси. При соотношении компонентов смеси 50% воды к 50% метанола скорость потока отличается примерно на 12% от заданной скорости.

4.3.3. Оптимизация градиента

Применение градиентного элюирования в жидкостной хроматографии с целью достижения возможно более полного разрешения пиков при минимальном времени анализов соответствует разделению в газовой хроматографии с программированием температуры. При этом развитие методов градиентного элюирования рассматривается скорее как искусство, чем наука. Отработанный метод ВЭЖХ анализа — это результат многочисленных, часто продолжительных шагов по оптимизации условий разделения:

- начальный и конечный состав подвижной фазы,
- крутизна градиента и
- выбор самих растворителей для градиента.

Так же, как в ГХ с температурным программированием, для этого существуют специальные компьютерные программы. Оптимизацию метода начинают с выполнения двух линейных градиентов, причем состав элюентов тот же самый в начале и в конце градиента, но градиенты имеют разный наклон. В программу вводятся названия компонентов, время удержания, площади пиков и факторы асимметрии. По этим данным программа как бы «калибруется» на используемую колонку и элюенты. Программа отвечает на три основных для разделения вопроса: выполнимо ли разделение, какое время градиента дает лучшее разрешение и насколько надежно разделение, т.е. как быстро уменьшается разрешение, если время градиента изменяется [4.7].

Затем программа симулирует наилучший линейный градиент. Для более сложной пробы лучшего разрешения можно достичь, если использовать градиент, разделенный на сегменты. Можно симулировать мультилинейные градиенты с различными сегментами. Даже изогнутые градиенты могут симулироваться подходящей комбинацией линейных сегментов. Идентификация пиков, масштабирование и возможность изменения шкал дают с первого взгляда исчерпывающую информацию об условиях разделения.

После того как были выбраны оптимальные условия градиента, можно быстро исследовать влияние таких факторов, как геометрия колонок, величина частиц сорбента и скорость потока. При этом время градиента автоматически подстраивается под вносимые изменения. Предсказанное компьютером и экспериментально измеренное время удерживания отличается, как правило, меньше, чем на 1%.

4.4. Системы ввода пробы

Ввод пробы должен обеспечивать воспроизводимую подачу на колонку точно определенного объема раствора пробы без прерывания потока элюента. Количество пробы зависит от чувствительности детектора к отдельным компонентам и

от разбавления пробы в хроматографической системе, а также и от допустимой нагрузки колонки.

Хорошая система ввода проста в обращении и вносит только незначительный вклад в уширение пиков. Разумеется, она должна обеспечивать воспроизводимость объема вводимой пробы. Кроме того, она должна допускать работу с высоким давлением до 400 бар и с различными объемами вводимой пробы. Очевидно также, что устройство ввода пробы должно быть химически инертным. Для специальных задач, таких как разделение белков, сегодня имеются системы ввода пробы, в конструкции которых отсутствует нержавеющая сталь и выполненных из титана, керамики или пластмассы.

Возможности ввода пробы многообразны и часто являются критическим пунктом при анализе, так как лучшие колонки могут давать плохие результаты, если устройство ввода пробы не соответствует предъявляемым к нему требованиям. Пожалуй, самый простой метод – это ввод пробы шприцом через прокладку, как это принято в газовой хроматографии. Проблемы при этом методе ввода возникают из-за высокого давления подвижной фазы. Более новые системы ввода делают возможными ввод пробы без всякого давления в дозирующую петлю непосредственно перед колонкой.

Сегодня обычно различают два вида ввода пробы: ручной и автоматический. При вводе пробы вручную дозирование может происходить либо с помощью шприца, либо через объем петли, причем последний метод ведет к более точным и воспроизводимым результатам и вообще сегодня рассматривается как более предпочтительный.

4.4.1. Ввод пробы через прокладку

Пожалуй, самый простой метод – это ввод пробы со шприцем через прокладку в блоке ввода. Прокладка – это эластичная, самоуплотняющаяся шайба из силиконовой резины, которую прокалывают иглой. При давлениях до 100 атм подходит хороший шприц для ГХ, если его поршень не слишком толст. Шприц объемом 100 мкл имеет уже такой толстый поршень, что при этих давлениях введение пробы становится невозможным. Специальные шприцы высокого давления дороги, но могут применяться до 400 атм. У этого метода есть то преимущество, что проба непосредственно впрыскивается на колонку и объемы пробы варьируются. Принцип представлен на рис. 4.13. Нужно выбирать, таким образом, длинные иглы, чтобы они доставали до поверхности сорбента, но ни в коем случае не повреждали ее. Ввод пробы должен происходить достаточно быстро.

4.4.2. Дозирующая петля

В качестве стандартного метода ввода пробы в ВЭЖХ используется дозирующая петля с шестиходовым краном, которая располагается непосредственно перед колонкой. Этот кран высокого давления обладает двумя положениями, LOAD и INJECT, как представлено на рис. 4.14. В зависимости от положения крана соответствующие каналы соединяются друг с другом.

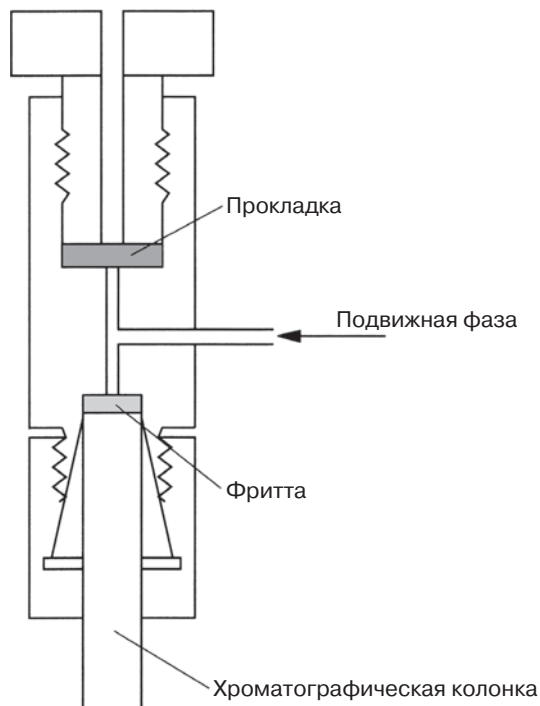


Рис. 4.13. Устройство ввода пробы через прокладку

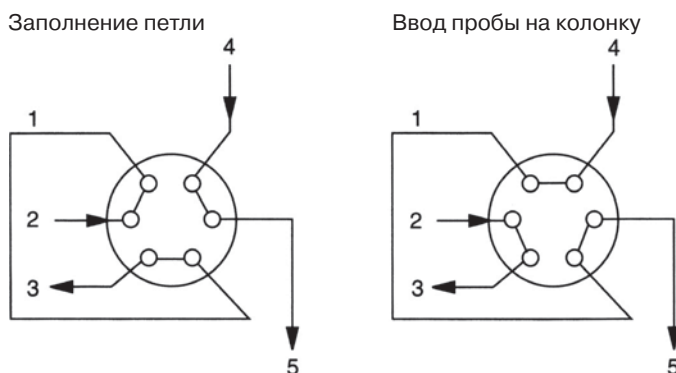


Рис. 4.14. Ввод пробы через дозирующую петлю: 1 – дозирующая петля; 2 – канал ввода пробы; 3 – канал сброса избытка пробы; 4 – канал соединения с насосом высокого давления; 5 – канал соединения с хроматографической колонкой

ПОЛОЖЕНИЕ LOAD – ЗАПОЛНЕНИЕ ПЕТЛИ

Пробу вводят в петлю с помощью шприца без давления с 3–5-кратным избытком объема петли для равномерного заполнения петли. Излишек отводится через соответствующий канал. В это время элюент продолжает поступать от насоса через кран на колонку при постоянном рабочем давлении.

ПОЛОЖЕНИЕ ИНЖЕСТ – ВВОД ПРОБЫ НА КОЛОНКУ

Клапан поворачивается в положение ввода. Теперь элюент идет от насоса через петлю и вымывает пробу на колонку.

Петли имеют объемы от 1 до 1000 мкл. Их можно легко заменять и монтировать в дозирующем кране. Преимущества петлевого ввода:

- выбранный объем очень хорошо воспроизводится и меньше зависит от оператора, чем при мембранном вводе, так что метод хорошо подходит для количественного анализа;
- не нужно вводить пробу против давления в системе и портить шприц;
- система может быть автоматизирована, переключение крана происходит либо пневматически, либо с помощью электродвигателя;
- также просто и быстро подаются большие объемы пробы, поэтому метод хорошо подходит для препаративной работы.

4.5. Колонки для ВЭЖХ

В современной ВЭЖХ используют сорбенты с величиной зерна от 3 до 10 мкм. Применение этих носителей стало возможно только после того, как для их применения были созданы соответствующие приборы и инструменты. Высокий стандарт качества и разнообразие предлагаемых сорбентов и готовых колонок в комбинации с эффективными приборами делают возможным быстрое проведение анализов с оптимальной селективностью и высокой чувствительностью. Эти параметры можно оптимизировать, варьируя размеры зерна, структуру пор, модифицируя сорбенты, размеры колонок и состав элюентов. На практике большинство проблем разделения можно решить с помощью небольшого числа сорбентов, если используют избирательность элюентов. Но для оптимизации определенных проблем разделения следует вернуться к модифицированным сорбентам со специфической селективностью, что позволит избежать больших затрат на определение оптимальных условий разделения.

Большое значение для разделяющей способности колонки имеют размер зерна и узкое распределение частиц сорбента по размерам. Вообще считается, что частицы с меньших размеров позволяют достичь лучших хроматографических характеристик. Тем не менее, часто, используя частицы несколько больших размеров (например, 7 мкм вместо 5 мкм), добиваются приемлемой разделяющей способности колонок при более коротком времени анализов и более продолжительном времени жизни колонки. Еще одну возможность оптимизации представляет применение сорбентов с узким распределением частиц по размерам.

Наряду с узким гранулометрическим составом сорбентов необходимо оптимальное заполнение ими колонок, и все хроматографические материалы для ВЭЖХ должны быть стабильны к давлению. Готовые колонки, полученные промышленным способом, гарантируют очень высокий стандарт, и поэтому пользователь вряд ли будет самостоятельно заниматься заполнением колонок. Плохое и неравномерное заполнение колонок приводит, кроме всего прочего, к образованию каналов в структуре слоя сорбента, к его проседанию и т.д. Образующийся



вследствие этого мертвый объем значительно ухудшает эффективность разделения или делает колонку непригодной.

В соответствии с используемыми сорбентами методы разделения подразделяют на:

- нормальнофазовую хроматографию (адсорбционная хроматография),
- обращеннофазовую хроматографию,
- эксклюзионную хроматографию.

За исключением эксклюзионной хроматографии эффект разделения в жидкостной хроматографии основывается на разной полярности стационарной и подвижной фазы.

4.5.1. Нормальнофазовая хроматография

В качестве материала для заполнения колонки используют силикагели или оксиды алюминия. Если рассматривают силикагель, то подразумевают, что матрица содержит свободные силанольные группы и, таким образом, является полярной фазой. Поверхностные силанольные группы «активны» и вступают с разделяемыми компонентами в диполь-дипольные взаимодействия (адсорбция). Так как стационарная фаза здесь полярная, подвижная фаза должна быть неполярная. Эти условия показаны на рис. 4.15. Молекулы пробы могут находиться как в полярной стационарной фазе, так и в неполярной подвижной фазе. Если молекула обладает полярными и, одновременно, неполярными частями, она ориентируется

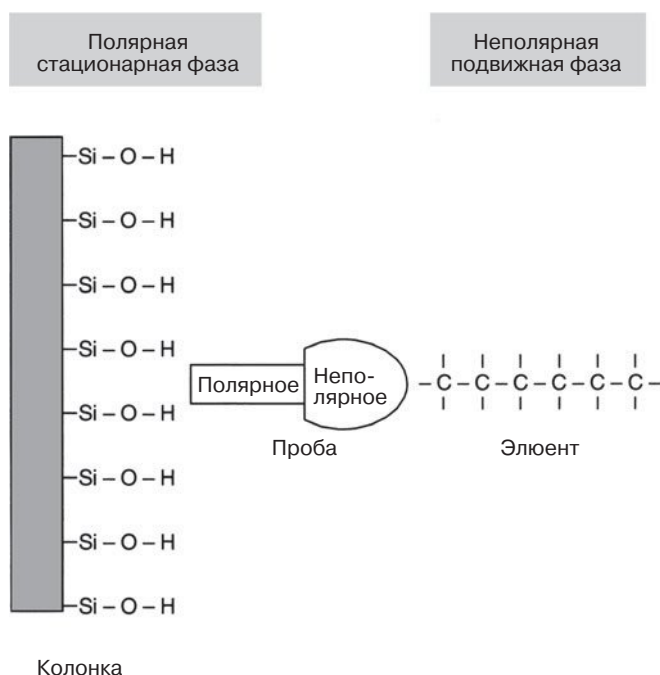


Рис. 4.15. Нормальнофазовая хроматография

таким образом, что полярные группы молекулы направлены преимущественно к полярной стационарной фазе и взаимодействуют с ней.

В качестве элюентов используют гексан, гептан, метилхлорид, уксусный эфир или их смеси. Из этого сразу вытекает ограничение для анализируемых проб: они должны быть не только растворимы в этих неполярных элюентах, но и находиться уже растворенными в этих неполярных растворителях. В неполярных растворителях разделяются преимущественно неполярные органические вещества. Полярные соединения, даже если они растворимы в элюентах, могут сильно взаимодействовать с поверхностью силикагеля, что приводит к пикам плохой формы или элюирование вообще не происходит. Поэтому нормальнофазовая хроматография применяется для умереннополярных проб, растворимых в органических растворителях.

Типичным недостатком адсорбционной хроматографии является сильное влияние следов воды в элюентах. Вода адсорбируется на поверхности силикагеля и дезактивирует силанольные группы, вследствие чего удерживание уменьшается. Поэтому используемые колонки нужно часто регенерировать (сушить).

4.5.2. Химически привитые полярные фазы

Под понятием «полярные или гидрофильные привитые стационарной фазы» понимают, в общем случае, силикагель, поверхность которого модифицирована полярными функциональными группами. Так же, как немодифицированный силикагель, эти сорбенты могут использоваться в нормальнофазовом режиме, причем они показывают обычно разную селективность. Они менее чувствительны к следам воды в подвижной фазе.

Это свойство делает их интересной альтернативой силикагелю. Они могут успешно применяться в адсорбционной хроматографии, в обращеннофазовой хроматографии и в ионообменной хроматографии [4.8]. В качестве функциональных групп для полярные привитых фаз предлагаются группы, представленные в табл. 4.1.

Таблица 4.1. Различные полярные привитые фазы

Обозначение	Функциональные группы	Применение
NH ₂	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	Адсорбционная хроматография, ионообменная хроматография, обращеннофазовая хроматография
CN	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CN	Адсорбционная хроматография, обращеннофазовая хроматография
ДИОЛ	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O-CHON-CH ₂ -OH	Адсорбционная хроматография, эксклюзионная хроматография

Гидрофильные привитые стационарные фазы предлагают интересную альтернативу для решения проблем ВЭЖХ. При использовании подходящих элюентов на этих модифицированных сорбентах могут действовать различные механизмы удерживания и, вследствие этого, проявляться особые эффекты разделения. Прежде всего, эти носители могут успешно применяться для разделения заряженных и среднеполярных соединений.

4.5.2.1. Диольная фаза

Наряду с широко распространенным применением в гелепроникающей хроматографии диольная фаза, прежде всего, используется при решении проблем разделения в адсорбционной хроматографии. Благодаря модификации эта фаза ведет себя подобно немодифицированному силикагелю, однако с отчетливо сниженной активностью. Диольные группы образуют в основном активные центры для адсорбционной хроматографии. Основным тип взаимодействий с хроматографируемыми соединениями – это образование водородных связей и индуцированные диполь-дипольные взаимодействия. Удерживание молекул пробы может варьироваться благодаря направленному изменению полярности органической подвижной фазы. Подобно немодифицированному силикагелю величины k' уменьшаются с ростом полярности элюентов. Это может быть объяснено тем, что с ростом содержания полярного компонента в подвижной фазе активные полярные молекулы растворителя занимают все больше активных мест на поверхности сорбента, предназначенных для хроматографии, и, тем самым, уменьшают взаимодействие с ними молекул пробы.

Если рассматривают последовательность удерживания сорбатов на диольной фазе в адсорбционной хроматографии, то всегда вещество с наименьшей полярностью удерживается слабее всего, а с наивысшей полярностью – сильнее всего.

4.5.2.2. NH_2 фаза

У этой стационарной фазы γ -аминопропильные группы ковалентно привязаны к поверхности силикагеля. Однако колонки с аминофазой на основе силикагеля лишь ограниченно устойчивы, так как, вероятно, происходит гидролиз частиц. Это проявляется в непрерывно уменьшающемся времени удерживания сорбатов в рутинной работе. В качестве носителей лучше подходят ПВА сополимеры, которые очень устойчивы механически и химически. Благодаря химической модификации эта стационарная фаза может взаимодействовать с молекулами пробы самыми разными способами. В нормальнофазовой хроматографии с гексаном, дихлорметаном и изопропанолом в качестве подвижной фазы разделяются полярные соединения, как, например, сложные эфиры, замещенные анилины и хлорированные пестициды. Как на слабом анионообменнике, на аминофазе могут разделяться анионы и органические кислоты, для чего применяется обычно ацетатный или фосфатный буфер с добавлением органических растворителей.

Это означает, что при соответствующем выборе растворителей удерживание разделяемых соединений вызывается различными механизмами. Если применяются чисто органические элюенты, существует возможность адсорбционно-хроматографического разделения. В этом случае NH_2 группа действует как незаряженный, полярный, слабоосновный адсорбционный центр.

Намного чаще аминофазы используются в сочетании с водными элюентами. Примером тому являются разделение моно- и олигосахаридов с водно-ацетонитрильными системами. Однако при использовании водных растворителей нужно учитывать, что аминогруппы существуют в протонированной форме. Это ведет к тому, что аминофаза действует в таких хроматографических условиях, как слабоосновный ионообменный сорбент. Поэтому ионообменная хроматография является основной областью применения аминофаз.

Сорбаты удерживаются в этом варианте хроматографии из-за различия в электростатических взаимодействиях и очень во многих случаях в соответствии с величиной их заряда. На NH_2 фазе, как в обычной ионообменной хроматографии, можно очень просто целенаправленно изменять удерживание компонентов пробы, варьируя содержание соли в подвижной фазе. С ростом содержания соли в элюентах удерживание веществ пробы уменьшается. Это объясняется тем, что добавленные в элюент ионы конкурируют с ионами пробы за ионогенные группы стационарной фазы.

С ростом концентрации соли в элюенте функциональные группы ионообменного сорбента все в большей степени экранируются и в меньшей мере взаимодействуют с ионами пробы. Незаряженные соединения, в общем случае, удерживаются на аминофазе довольно слабо. Содержание соли в элюентах мало или вовсе не влияет на их удерживание.

4.5.2.3. CN фаза

Цианофаза представляет особенно интересную стационарную фазу в ВЭЖХ в рамках гидрофильно модифицированных сорбентов. Среднеполярная стационарная фаза образуется химической прививкой γ -цианопропильных групп на поверхности силикагеля. В соответствии с выбором подвижной фазы этот сорбент может успешно применяться как для нормальнофазовой, так и для обращеннофазовой хроматографии. В нормальнофазовой хроматографии с относительно неполярными растворителями CN фаза разделяет многие соединения, которые могут разделяться также и на немодифицированном силикагеле. Преимущество этого сорбента — быстрое установление равновесия при градиентном элюировании.

При использовании неполярных элюентов (например, изооктана) сильнее всего удерживаются самые полярные вещества. С увеличением полярного характера элюента при добавлении диоксана соединения удерживаются все меньше до полного прекращения удерживания. Только добавлением воды к растворителю (дальнейшее повышение полярности) разделение становится снова возможным. Разумеется, теперь ряд последовательности элюции обратится, и самые полярные соединения удерживаются слабее всего. Повышение содержания воды в подвижной фазе вызывает дальнейший рост величины k' . Это — известный феномен в обращеннофазовой хроматографии. CN фаза особенно подходит для разделения среднеполярных соединений.

4.5.3. Обращеннофазовая хроматография

Как видно уже из названия, здесь работают с противоположным соотношением полярностей, т.е. стационарная фаза — неполярная, а подвижная фаза — полярная. В этом случае силикагель модифицируется химически. Обращенные фазы получают, если поверхность силикагеля покрывают гидрофобными функциональными группами. Стабильнее всего соединения, в которых функциональная группа связана через ковалентную связь Si—C, которая химически стабильна в области pH от 1 до 9. Наибольшее количество разделений в аналитике проводится в ВЭЖХ с модифицированными стационарными фазами. В зависимости от вида функциональной группы для обозначения колонок используют сокращения, указанные в табл. 4.2.

Таблица 4.2. Доступные материалы для обращенной фазы

Модификация	Функциональная группа
C ₂	Этил
C ₄	Бутил
C ₈	Октил
C ₁₈	Октадецил
C ₆ H ₅	Фенил

В качестве подвижной фазы используется вода, полярные органические растворители (метанол, ацетонитрил) или их смеси. Этим методом можно разделять широкий круг соединений, так как многие вещества растворимы в воде или подобных растворителях. Развитие техники обращеннофазовой хроматографии (ОФХ) с химически связанными обращенными фазами позволило значительно расширить область применения ВЭЖХ. Более 70% анализов методом ВЭЖХ проводятся сегодня на химически связанных фазах.

Принцип ОФХ представлен на рис. 4.16. Химически модифицированный алкильными группами силикагель образует неполярную стационарную фазу, подвижная фаза — полярная. Неполярные молекулы или соответственно неполярные группы в молекулах предпочтительнее удерживаются на неполярной стационарной фазе.

Вода часто обозначается как самый сильный элюент в хроматографии. Однако это справедливо только для адсорбционной хроматографии (нормальнофазовая): вода может вступать в очень сильное взаимодействие с активными центрами силикагеля и оксида алюминия, так что молекулы пробы больше не могут адсорбиро-

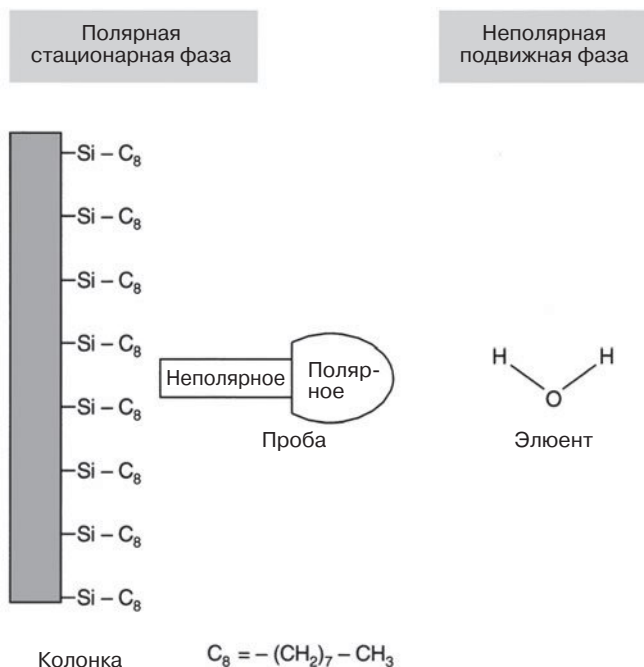


Рис. 4.16. Обращеннофазовая хроматография

ваться и быстро элюируются. В ОФХ все с точностью до наоборот: вода не может смачивать аполярные (гидрофобные) алкильные группы и не вступает с ними во взаимодействие. Поэтому это самая слабая из всех мобильных фаз и медленнее всего элюирует пробу. Чем больше содержание воды в элюенте, тем дольше время удержания. Поэтому разделение на ОФ можно легко оптимизировать, варьируя состав подвижной фазы: с возрастающим содержанием органического растворителя полярность подвижной фазы и, вместе с тем, время удерживания уменьшается.

ОФ матрицы, C2, C4, C8, C18 и фенил, отличаются временем удерживания веществ. С ростом длины алкильных групп поверхность становится неполярной. Как показано на рис. 4.17, время удерживания в тех же самых хроматографических условиях (подвижная фаза, скорость потока) для C18 (ОФ-18, англ. RP-18) для многих веществ примерно вдвое больше, чем для C8 (ОФ-8, англ. RP-8). Самое большое время удерживания получают при использовании сорбента C18 как самой неполярной стационарной фазы и воды как самой полярной подвижной фазы.

Механизмом разделения, который лежит в основе ОФХ, — это притяжение за счет Ван-дер-Ваальсовых сил между углеводородными фрагментами молекул пробы и привитыми алкильными группами сорбента. Чем больше углеводородная часть в молекулах, тем сильнее они притягиваются. Это различие в химической структуре молекул приводит к более сильной или более слабой их адсорбции на стационарной фазе и, вместе с тем, к разделению. Вещества удерживаются ОФ поверхностью тем сильнее, чем меньше они растворимы в воде, т.е. чем более они неполярны. Полярные вещества элюируются раньше, чем неполярные.

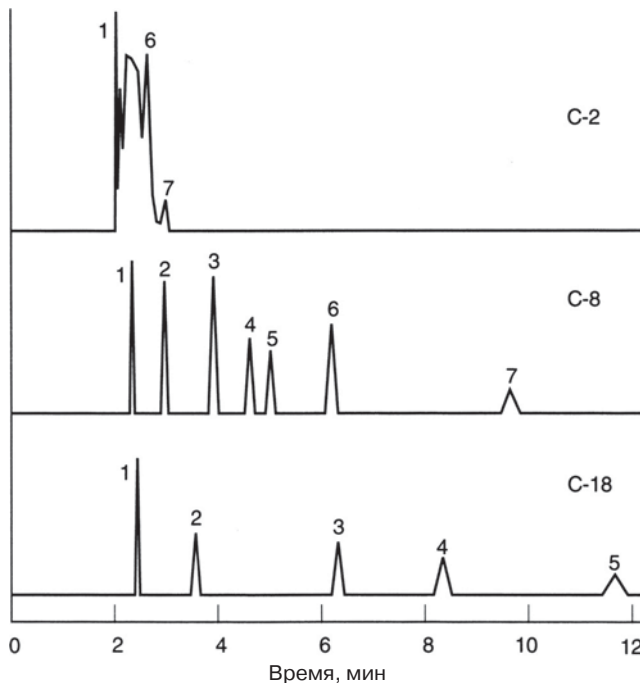


Рис. 4.17. Влияние типа ОФ сорбента на время удерживания



Хотя привитые на поверхность силикагеля фазы представляют собой мономерный органический слой, они отличаются высокой поверхностной концентрацией функциональных групп. Она составляет от 3 до 4 функциональных групп на 100 \AA^2 . Так как привитой фазой невозможно закрыть абсолютно все силанольные группы, то различные производители пытаются осуществлять в дополнительной стадии модификации так называемое дозакрытие (англ. «endcapping»), чтобы модифицировать оставшиеся после первой обработки силанольные группы. Цель состоит в уменьшении активных центров на поверхности путем перевода активных силанольных групп в индифферентные группы. Пожалуй, наиболее широко используемым реагентом для дозакрытия является триметилхлорсилан.

Различные стадии модификации силикагеля представлены на рис. 4.18. Часть *a)* показывает поверхность немодифицированного силикагеля. Поверхностные си-

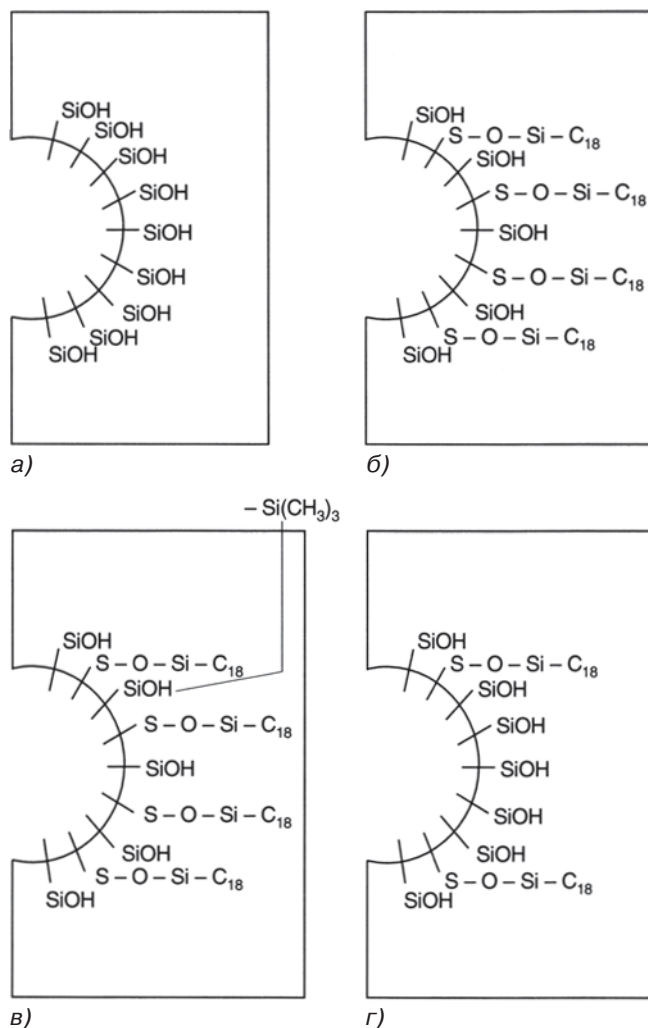


Рис. 4.18. Типы модификации силикагеля

ланольные группы «активны» и вступают во взаимодействие с ионными и полярными соединениями. Часть б) показывает модифицированный, привитой силикагель. Однако преобразование поверхностей никогда не может быть полным. На поверхности остается много активных силанольных групп. Часть в) показывает процесс дозакрытия. Маленькие нейтральные группы прививаются к большинству из оставшихся силанольных групп, чтобы уменьшить активность поверхности силикагеля. Часть г) показывает процесс «старения» колонок с обращенной фазой. В принципе, силикагельная основа, к которой привиты все фазы, нестабильна. Силикагель растворяется при повышенных величинах pH (до кремниевой кислоты) и подвергается разрушению также при нейтральных pH в водной среде. Из-за медленного, но непрерывного растворения кремниевой подложки свободные силанольные группы снова становятся все более и более доступными. Активность поверхности снова повышается. Это выражается в уменьшении времени удерживания до тех пор, пока колонку, наконец, нужно будет заменить.

Поэтому в последнее время как носитель для химически привязанных фаз стал использоваться сополимер поливинилового спирта. Все же первоначально разделяющая способность колонок на полимерной основе была значительно хуже, чем разделительная способность колонок на основе силикагеля. Но дальнейшее развитие принесло свои плоды. На сферических частицах сополимера поливинилового спирта была достигнута высокая плотность ковалентно привитых углеводородных цепей. Сегодня хроматографическое поведение этих фаз практически сравнимо с обычными ОФ колонками. Гидрофильные частицы не имеют проблем со свободными силанольными группами и микропорами. Ковалентная связь между полимерными частицами и алкильными группами делает возможным использование сильнощелочных буферов до величины pH примерно 13. Напротив, привитые фазы на основе силикагеля становятся нестабильными выше pH 7.

Колонки с обращенной фазой лучше подходят для решения широкого круга задач, чем колонки какого-либо другого типа. Для анализа неизвестного вещества сначала проводят пробное разделение на обращеннофазовой колонке.

4.5.4. Эксклюзионная хроматография

Эксклюзионная хроматография (англ.: Size exclusion chromatography, SEC) – это метод жидкостной хроматографии, который позволяет анализ молекул в области олигомеров и полимеров. При использовании органических элюентов метод становится также гелифилтрационной хроматографией (ГФХ, англ.: GFC), а при водных элюентах – упомянутой гелипроникающей хроматографией (англ. GPC). При этом большие молекулы пробы разделяются согласно эффективному размеру в растворе. Основное преимущество эксклюзионной хроматографии состоит в возможности на основании предсказываемых времен удерживания определять распределение молекулярных масс в области примерно от 10^2 до 10^7 Da. Можно разделять смеси компонентов, отличие молекулярных масс которых составляет около 10%.

Большинство полимеров представляет собой смесь из молекул с различными молекулярными массами и молекулярными размерами. Эта смесь характеризует-

ся молекулярно-массовым распределением полимера (ММР). ММР – это важная характеристика для предсказания физического и химического поведения полимеров, так как ММР влияет на текучесть, активность, твердость и различные другие механические свойства полимера. Анализ ММР применяется при контроле качества как исходных материалов, так и готовых продуктов.

Эксклюзионная хроматография разделяет молекулы пробы по их гидродинамическому объему или по эффективной величине молекулы в растворе. Она принципиально отличается от всех других методов хроматографии. Здесь разделение обусловлено не какими-то взаимодействиями сорбата со стационарной и подвижной фазами, а является следствием простого процесса сортировки молекул по размерам. Для этого хроматографическая колонка заполняется частицами по возможности одинакового зернения. Самым важным требованием для разделения молекул по размерам является то, что частицы должны быть очень пористы и поры должны иметь определенный размер. Эксклюзионная хроматография – это неdestructивный метод без какого-либо взаимодействия между сорбатом и сорбентом, в котором разделение достигается за счет того, что молекулы пробы принудительно двигаются через твердый, высокопористый материал, который помещен в колонку из нержавеющей стали.

На рис. 4.19 представлено наглядное пояснение для пор конической формы. Маленькие молекулы пробы разделяемого полимера величины *C* проникают также в более тесные поры и вследствие этого дольше удерживаются до тех пор, пока они снова не диффундируют в подвижную фазу. Самые большие молекулы *A* не могут проникнуть в поры и непосредственно транспортируются подвижной фазой и, таким образом, покидают хроматографическую колонку первыми. Моле-

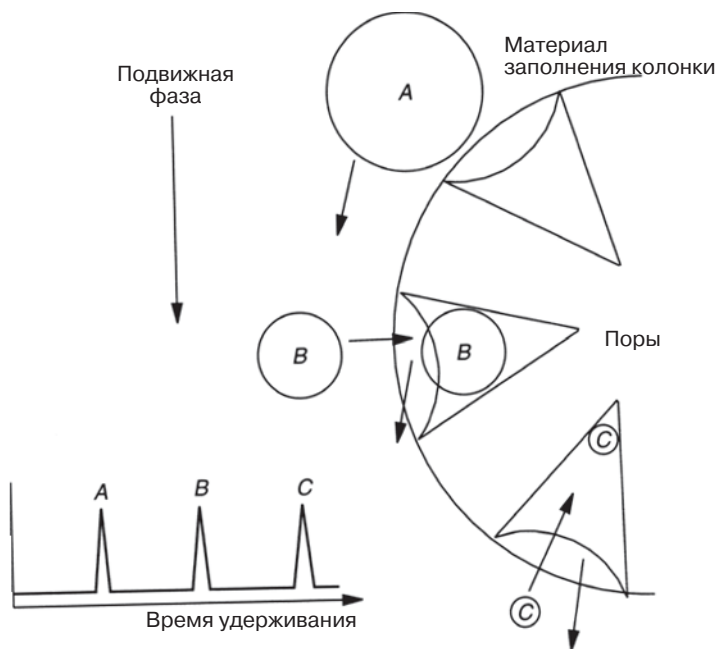


Рис. 4.19. Механизм разделения в эксклюзионной хроматографии

кулы средней величины В могут только наполовину проникать в поры. Так как сорбционные взаимодействия со стационарной фазой в гельпроникающей хроматографии при правильном выборе мобильной фазы исключаются, то компоненты элюируются в последовательности А, В и С, т.е. большие молекулы будут выходить вначале, а самые маленькие — в самом конце.

Чтобы достичь оптимального разделения олигомеров или, соответственно, полимеров, предлагаются сорбенты с различными размерами пор. Их различают либо по величине пор, либо по границе исключения. Граница исключения соответствует молекулярному весу фракции полистирола или декстрана, который еще может проникать в гель и является при этом мерой пористости геля. Из вышесказанного можно заключить, что:

- все введенные молекулы будут элюированы;
- хроматографирование закончено, когда из колонки элюируется неудерживаемый компонент (мертвое время). Таким образом, заранее известно, как долго будет проходить разделение;
- время элюирования зависит только от размера молекулы, но вместе с тем пусть даже косвенно — от ее молекулярной массы. Гельфильтрацию можно использовать для определения молекулярной массы;
- так как разделение заканчивается уже после прохождения небольшого объема, пиковая емкость (т.е. количество пиков, которые могут быть разделены с определенным разрешением) ограничена;
- чтобы молекулы двух разных масс можно было разделить друг от друга, их молярные массы должны отличаться минимум на 10%;
- с ростом времени удерживания не происходит уширения пиков;
- поскольку в системе отсутствуют какие-либо равновесные взаимодействия, то колонку едва ли можно перегрузить. Можно разделять относительно большие пробы.

На рис. 4.20 наглядно продемонстрирован механизм разделения.

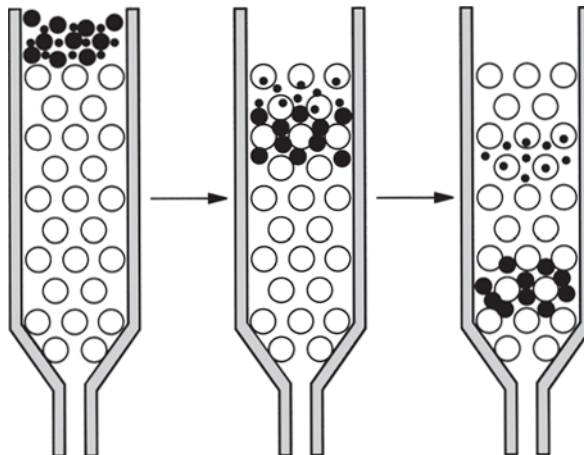


Рис. 4.20. Схема трех этапов гельпроникающей хроматографии



У молекулы пробы, которые слишком велики, чтобы проникать в поры, есть только объем между отдельными шариками: они исключаются и должны искать себе путь между шариками в колонке. Так как шарики не входят с ними ни в какое взаимодействие, эти молекулы проходят колонку по наиболее короткому пути и элюируются из колонки вместе с подвижной фазой.

Напротив, если в пробе имеются молекулы, которые, благодаря своим малым размерам, могут проникать в поры, то в их распоряжении весь объем подвижной фазы. Так как подвижная фаза в порах неподвижна, то молекулы двигаются в порах только за счет диффузии и будут задерживаться по сравнению с исключенными молекулами. Они последними появятся в детекторе, а именно с задержкой, точно равной мертвому времени системы, которое известно из других методов колоночной хроматографии. Сам растворитель не вступает во взаимодействие со стационарной фазой, но тем не менее проходит по всем порам. Поэтому в любом другом методе колоночной хроматографии молекулы растворителя первыми окажутся в детекторе. В эксклюзионной хроматографии такие маленькие молекулы как молекулы растворителя будут выходить последними. Они полностью проникают в стационарную фазу. Называют это «полным проникновением» (англ. *totale penetration*). Каждый компонент будет выходить из колонки самое позднее через мертвое время.

Молекулы средней величины не могут проникать в самые узкие поры. Они только частично проникают в стационарную фазу. Занимаемый ими объем находится между объемом «полного проникновения» и мертвым объемом. Они элюируются после «исключенных» молекул, но раньше «мертвого времени».

Если хотят знать, какому объему элюции следует отнести молекулы определенной величины, то колонку калибруют по тестовой смеси стандартных веществ с точно известными молекулярными массами. В результате получают примерно линейное соотношение между логарифмом молекулярной массы и объемом элюирования. Как стандарты при разделении полимеров, растворимых в органических растворителях, применяют преимущественно полистиролы, а для полимеров растворимых в воде — декстраны, которые имеют различные, но точно известные молекулярные массы. Рис. 4.21 показывает хроматограмму олигомеров стирола с $n = \text{от } 1 \text{ до } 14$.

Крайний пик справа принадлежит мономеру стирола. Это — самая маленькая молекула (наряду с молекулами подвижной фазы) и она будет элюироваться последней. Соответствующий объем элюирования — это мертвый объем V_0 , первый маленький пик слева принадлежит исключенным молекулам. Соответствующий объем — это межгранульный объем V_z , (жидкость, которая находится между отдельными шариками стационарной фазы). Между V_z и V_0 элюируются молекулы со степенью полимеризации n от 14 до 1. Объем $V_0 - V_z$ соответствует объему пор стационарной фазы V_p (жидкость, которая находится в порах). V_p — это единственный полезный для разделения объем и поэтому он должен быть как можно больше, так как разрешение пиков зависит от V_p .

Если теперь хотят охарактеризовать неизвестную фракцию или определить молекулярно-массовое распределение полимера, то сравнивают хроматограмму пробы с калибровочной кривой. Так как объем элюирования соответствует раз-

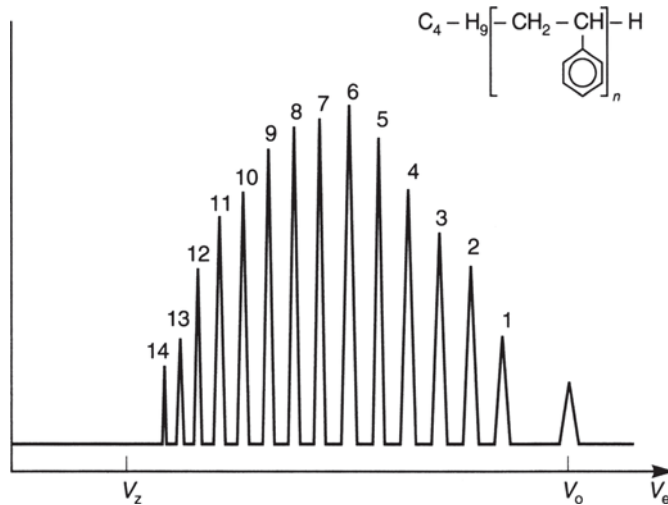


Рис. 4.21. Эксклюзионная хроматограмма олигомеров стирола

меру молекулы, а не ее массе, это сравнение верно только для молекул одного и того же вида в одинаковом растворителе. Причина заключается в том, что в этом хроматографическом методе разделение происходит соответственно гидродинамическому объему, а не молекулярной массе. Поэтому для неизвестных веществ молекулярная масса может быть определена только с известными ограничениями.

Существует возможность пересчитать калибровочную кривую для наиболее часто используемых полистирольных стандартов на калибровочную кривую для других полимеров, но если нужно определять молекулярные веса, то все же лучше всего калибровать колонку со стандартом, химическая природа которого возможно больше походит на свойства пробы. Одна и та же молекула может иметь разную величину в различных растворителях и элюироваться, таким образом, с разной скоростью. Клубковая молекула может набухать или сжиматься. Также молекула может быть сольватирована в растворителе и казаться вследствие этого больше, чем есть на самом деле. Для точного определения молекулярного веса с помощью эксклюзионной хроматографии есть детектор, чувствительный к молекулярной массе, который работает на принципе малоуглового лазерного светорассеяния [4.9].

Определения молекулярных масс и распределений молекулярных масс с помощью гельпроникающей хроматографии просты и быстры. Так как они опираются, однако, исключительно на объемы элюирования, то объемы должны определяться с большой точностью. Подвижная и стационарная фазы в эксклюзионной хроматографии должны удовлетворять только трем требованиям, а именно:

- подвижная фаза должна быть хорошим растворителем для пробы;
- проба не должна вступать ни в какие взаимодействия со стационарной фазой;
- подвижная фаза не должна разрушать стационарную фазу.



Если эти три условия выполнены, то эксклюзионная хроматография – это относительно безпроблемный, простой, широко применимый и быстрый метод разделения [4.10]. Разумеется, для подвижных фаз следует вводить ограничения. В гель-проникающей хроматографии с органическими растворителями используется стиролдивинильный сополимер, который в некоторых случаях может набухать или сжиматься. Силикагель хуже подходит для ГПХ из-за его адсорбционных свойств. В гелифильтрации, наоборот, используют гидрофильные гели, такие как полиакриламиды, полисахариды, метакрилаты и т.д., которые обладают очень незначительной механической прочностью. Они сильно склонны к набуханию или сжатию. Здесь предпочтительнее использовать химически модифицированный силикагель.

В эксклюзионной хроматографии величина пор стационарной фазы должна соответствовать гидродинамическому размеру молекулы в растворе. Доступны стационарные фазы с величинами пор от 100 до 10^6 ангстрем. Это позволяет перекрыть примерно такой же диапазон молекулярных масс. Теперь остается только выбрать стационарную фазу и элюент, но таким образом, чтобы не было никаких адсорбционных взаимодействий, то есть поверхность стационарной фазы по полярности и химической структуре должна быть похожа на элюент и хроматографируемые вещества. С помощью эксклюзионной хроматографии на крупнопористом носителе можно также проводить препаративные разделения [4.11].

Хотя эксклюзионная хроматография разрабатывалась для задач полимерной химии, она оказалась полезным, позволяющим сэкономить время методом и при решении других проблем разделения. Этот метод все чаще применяется в последовательном анализе сложных смесей в пищевой промышленности, экологической аналитике и фармацевтической индустрии. Фракции пробы, собранные при эксклюзионной хроматографии, можно анализировать затем другими физическими или химическими методами.

4.6. Выбор методов ВЭЖХ анализа

Три сегмента – пробоподготовка, хроматографическое разделение и детектирование – следует рассматривать как тесно связанные друг с другом и поэтому всегда взаимозависимые и соответствующие данной аналитической проблеме. Большое разнообразие методов разделения, многочисленные методы детектирования и широкая автоматизация всех этапов анализа являются основой точных и экономичных анализов [4.12].

4.6.1. Пробоподготовка

Первый шаг пробоподготовки состоит в большинстве случаев в том, чтобы перевести все анализируемые вещества, которые содержатся в пробе, в раствор. Для растворения или экстракции должен использоваться растворитель, в котором исследуемые вещества обладают особенно хорошей растворимостью, чтобы гарантировать полноту извлечения.

Однако поскольку при этом растворяются и многие другие вещества, то эту «первичную пробу» во многих случаях нельзя использовать непосредствен-

но для ВЭЖХ анализа. Загрязнение колонки из-за адсорбции сторонних компонентов и, как следствие этого, изменение хроматографического поведения колонки, например, смещение времен удерживания, делают невозможным воспроизводимый анализ. Отделение матрицы может происходить разными способами. Иногда проблему решают использование предколонки и ее регулярная замена. Тем не менее, часто при пробоподготовке необходимо вводить дополнительную стадию отделения матрицы. Здесь помогает специфическая экстракция анализируемых веществ из первоначальной пробы.

Экстракция, согласно общепринятой точке зрения, может происходить при распределении вещества между двумя жидкими фазами. С другой стороны, хроматографический метод, а именно экстракция целевых компонентов твердой фазой из жидкости с их адсорбцией на твердой фазе, которая в большинстве случаев подобна хроматографической фазе, и последующая десорбция, лучше подходят для дальнейшего разделения. Твердофазную экстракцию (ТФЭ, Solid phase extraction, SPE) невозможно больше отделить от современной аналитики. Удаление мешающей матрицы или концентрирование следовых компонентов пробы часто необходимо, чтобы либо избежать перекрывания пиков, либо повысить слишком низкую концентрацию следового компонента.

Для определения следовых количеств вещества в водной пробе с использованием ТФЭ большие объемы водной пробы подают на колонку. Затем пробу элюируют небольшим количеством растворителя. Из-за малого потребления растворителя, невысоких временных затрат и прекрасной эффективности экстракции при методической простоте твердофазная экстракция все больше вытесняет обычную жидкость-жидкостную экстракцию. Таким образом, становится возможным «вырезать» из смеси вещества, сходные по своей полярности. Подходящие для ТФЭ «мини-колоночки» предлагаются в настоящее время несколькими фирмами. Эту технику можно автоматизировать с помощью системы переключения колонок.

При разделении неподготовленных растворов проб рекомендуется использовать короткую предколонку, которую необходимо часто менять. Таким образом, можно значительно продлить жизнь аналитической хроматографической колонки. Предколонки содержат тот же сорбент, который используется в аналитической колонке. Тем не менее, они не должны вызывать предварительное разделение пробы, а должны удерживать компоненты пробы или ингредиенты раствора с высоким k' . Недостатком предколонки является то, что пики становятся шире за счет прохождения дополнительного пути через слой сорбента.

4.6.2. Хроматографическое разделение

Для выбора условий разделения необходимо знать, прежде всего, химические и физические свойства анализируемой смеси веществ. Стационарная и подвижная фазы для разделения должны соответствовать химической структуре, полярности, растворимости, функциональным группам и молекулярному весу веществ в анализируемой смеси. Основываясь на этих данных, разделение можно проводить согласно химическому различию анализируемых веществ или различию в



молекулярных массах. В общем случае, целесообразно провести литературный поиск, чтобы найти конкретные указания о возможных условиях разделения.

Разделение по химическим свойствам основывается на химических законах об адсорбции и/или распределения. Главными здесь являются три параметра – вещество, элюент и стационарная фаза. Элюент и стационарную фазу нужно выбирать соответственно полярности смеси веществ. Здесь действуют следующие правила:

Неполярное вещество требует неполярного элюента и полярной стационарной фазы.

Этот подход называется нормальнофазовой хроматографией. Противоположностью ему является метод, который называют обращеннофазовой хроматографией:

Полярное вещество требует полярного элюента и неполярной стационарной фазы.

Различия в полярности анализируемых компонентов смеси определяют, должен ли анализ быть изократическим или происходить с градиентом элюента. Эффективность разделения растет с уменьшением диаметра частиц материала, заполняющего колонку. Эффективность колонок, заполненных частицами размером 3 мкм, очень высока, и число теоретических тарелок достигает от 100 000 до 125 000 на метр длины колонки. С этим связано, однако, высокое давление, необходимое для подачи подвижной фазы. Поэтому для частиц такого размера нужно рекомендовать колонки не стандартной длины 25 см, а более короткие колонки длиной 10 см.

4.6.2.1. Условия нормальнофазовой хроматографии

Хроматографическое разделение на силикагеле или оксиде алюминия как стационарной фазе происходит вследствие адсорбции. У силикагеля активные места – это силанольные группы ($-\text{Si}-\text{OH}$), у оксида алюминия это, прежде всего, Al^{3+} центры, но также и связанные O^{2-} атомы. Они создают некий вид слабой «связи» с каждой молекулой, находящейся поблизости, если возможно одно из следующих взаимодействий:

- диполь- индуцированный диполь,
- диполь-диполь,
- образование водородных мостиков и
- образование π -комплексов.

Эта возможность существует, если молекула обладает одним или несколькими атомами с неподеленной свободной парой электронов или содержит двойную связь для образования π -комплекса; так называемую другими словами, если молекула содержит так называемую функциональную группу или кратные связи. Напротив, алканы едва ли могут взаимодействовать, так как они насыщены и состоят только из атомов С и атомов Н, которые не имеют свободных электронных пар. Если у молекулы есть несколько функциональных групп, то за удерживание отвечает наиболее полярная группа. Базируясь на этой концепции, можно сделать три вывода:

- силикагель в хроматографической колонке со всех сторон окружен подвижной фазой. Растворитель более или менее прочно сорбирован на всех активных центрах. Молекула пробы может адсорбироваться на поверхности силикагеля, только если взаимодействие сорбента с ней сильнее, чем его взаимодействие с растворителем;
- все молекулы пробы и, естественно, молекулы растворителя ориентированы на поверхности силикагеля таким образом, что их функциональные группы или двойные связи находятся вблизи силанольных групп. Имеющиеся в молекулах углеводородные фрагменты направлены в сторону от поверхности силикагеля. Поэтому сорбент не может дифференцировать молекулы, которые отличаются только алифатическим радикалом. Смесь бутанола, пентанола и октанола нельзя хорошо разделить адсорбционной хроматографией;
- сила взаимодействия сорбата с сорбентом зависит не только от функциональных групп молекул пробы, но и от пространственных факторов. Молекулы, которые отличаются трехмерной структурой, т.е. стереоизомеры, можно хорошо разделять с помощью адсорбционной хроматографии.

Из первого вышеупомянутого заключения ясно, что не каждый растворитель элюирует молекулы пробы мгновенно и быстро. Если подвижная фаза — это алифатический углеводород, например, гексан, то он может плохо вытеснять молекулы пробы с активных мест сорбента. Такой растворитель называют слабым. Напротив, метиленхлорид — это сильный конкурент за активные центры, так что молекулы пробы меньше времени остаются адсорбированными и будут быстро элюированы. Этот растворитель называют относительно сильным.

ЭЛЮОТРОПНЫЙ РЯД

Эта сила элюирования или вытесняющая сила различных растворителей определялась эмпирически и принималась как числовое значение, обозначаемое символом E^0 . Такую последовательность, найденную для слабых, средних и сильных растворителей, называют элюотропный ряд. Оказывается, что элюенты упорядочены согласно своей полярности. В адсорбционной хроматографии сильный растворитель является полярным, а слабый — неполярным.

В табл. 4.3 для сорбента оксида алюминия указаны значения E^0 , которые не сильно отличаются и для силикагеля. Последовательность растворителей не меняется при переходе от оксида алюминия к силикагелю.

В качестве подвижной фазы в адсорбционной хроматографии используют растворители из неполярной части элюотропного ряда, то есть от *n*-пентана до этиленхлорида. Более полярные, чем диоксан, элюенты использовать не имеет смысла, так как они очень сильно адсорбируются и, как следствие, образуется скорее жидкость-жидкостная распределительная система. Из предосторожности сначала используют наиболее сильный растворитель, чтобы гарантированно элюировать пробу. Если полученные значения k' слишком малы, то переходят к несколько более слабому растворителю, который элюирует компоненты пробы с оптимальными факторами удерживания между 1 и 5, а для сложных смесей — до 10.



Таблица 4.3. Элюотропный ряд

Растворитель	Полярность $E^{\circ} (Al_2O_3)$	УФ граница, нм	Растворитель	Полярность $E^{\circ} (Al_2O_3)$	УФ граница, нм
Фторалканы	-0,25	190	Н-пентан	0,00	210
Гексан	0,00	210	Изооктан	0,01	210
Петролейный эфир	0,01	210	Н-декан	0,04	200
Циклогексан	0,04	210	Циклопентан	0,05	210
Диизобутилен	0,06	210	1-пентен	0,08	210
CS ₂	0,15	380	CCl ₄	0,18	265
Амилхлорид	0,26	225	Бутилхлорид	0,26	220
Ксилол	0,26	290	Изопропиловый эфир	0,28	220
Изопропилхлорид	0,29	225	Толуол	0,29	285
Н-пропилхлорид	0,30	225	Хлорбензол	0,30	290
Бензол	0,32	280	Этилбромид	0,37	225
Этиловый эфир	0,38	220	Этилсульфид	0,38	290
Хлороформ	0,40	245	Метиленхлорид	0,42	245
Метилбутилкетон	0,43	330	Тетрагидрофуран	0,45	220
1,2-дихлорэтан	0,49	230	Метилэтилкетон	0,51	330
1-нитропропан	0,53	380	Ацетон	0,56	330
Диоксан	0,56	220	Этилацетат	0,58	260
Метилуксусный эфир	0,60	260	Аниловый спирт	0,61	210
Диметилсульфоксид	0,62	270	Анилин	0,62	295
Диэтиламин	0,63	275	Нитрометан	0,64	380
Ацетонитрил	0,65	200	Пиридин	0,71	305
Бутилцеллозольв	0,74	220	Изо-/н-пропанол	0,82	210
Этанол	0,88	210	Метанол	0,95	210
Этиленгликоль	1,11	210	Уксусная к-та	высокая	200
Вода	выше	190	Растворы солей и буферные растворы	очень высокая	190

Смеси растворителей могут показывать эффекты особенной избирательности, так что можно этим способом установить подходящую силу растворителя и обойтись некоторыми немногими растворителями, а не приобретать весь элюотропный ряд для оптимальной хроматографии.

Силикагель и оксид алюминия только медленно приходят в равновесие с подвижной фазой. Поэтому нужно избегать больших различий в растворителях в элюотропном ряду в интересах по возможности быстрого уравнивания колонок. Если тетрагидрофуран заменяют непосредственно на н-пентан, то достижение нового равновесия продолжается часами. Лучше всего вообще избегать любой замены растворителя и покупать колонки по числу используемых подвижных фаз. Таким образом, аналитик будет иметь одну колонку для гексана, одну для изопропилового эфира, одну для метиленхлорида и т.д.

Так как силикагель и оксид алюминия медленно уравниваются с подвижной фазой, то адсорбционные колонки не подходят для градиентного элюирования.

Если при проверке проба при элюировании гексаном идет вместе с фронтом или же она не элюируется диоксаном, то разделение методом адсорбционной хроматографии такой пробы невозможно. Можно попытаться разделить ее на обращенной фазе или ионообменной хроматографией.

4.6.2.2. Условия обращеннофазовой хроматографии

О хроматографии на обращенной фазе говорят всегда в том случае, когда стационарная фаза менее полярна, чем подвижная фаза. Хроматография с обращением фаз может быть отнесена с вескими основаниями либо к адсорбционной хроматографии, либо к распределительной хроматографии. Чаще всего применяемая стационарная фаза – это химически привитой на поверхность силикагеля октадецилсилан ОДС, нормальный алкан с 18 атомами С. Используются, однако, С8- и более короткие алкильные цепи, а также циклогексановые- и фенильные группы. Фенильные остатки несколько более полярны, чем алкильные группы.

Вещества пробы тем сильнее удерживаются обращеннофазовым сорбентом, чем меньше они растворимы в воде, т.е., чем более они неполярны. Чаще всего используются смеси воды и метанола. Почти все пробы элюируются между 10% и 90% метанола или ацетонитрила в воде. Это выгодно также в финансовом отношении, так как вода «бесплатна» (все же это должен быть бидистиллят), а метанол – один из самых дешевых растворителей. К сожалению, у смесей воды и метанола действительно высокий максимум вязкости, так что при работе с ними обычно требуется гораздо более высокое давление, чем для других подвижных фаз.

Смеси ацетонитрила и воды также часто используются, и это хорошая альтернатива водно-метанольной системе, так как ацетонитрил в отличие от метанола является апротонным растворителем и проявляет, таким образом, другую избирательность. Проблематична большая токсичность ацетонитрила ($\text{CH}_3\text{-CN}$), так что точно необходимо позаботиться о его регенерации с помощью дистилляции.

В обращеннофазовой хроматографии часто применяются водные растворы проб, которые могут содержать ионогенные материалы. Ионные вещества пробы не задерживаются обращеннофазовой колонкой; они лучше всего делятся с помощью ионообменной или ионпарной хроматографии. Все же обращеннофазовая хроматография возможна, если смесь содержит, наряду с нейтральными веществами, либо только слабую кислоту, либо только слабое основание. В первом случае подвижная фаза закисляется, во втором случае – защелачивается. Проблемные компоненты пробы находятся тогда в недиссоциированной форме и, соответственно, удерживаются колонкой.

ПРЕИМУЩЕСТВА ОБРАЩЕННОФАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

На обращенной фазе можно разделять как полярные, так и совсем неполярные вещества, а следовательно, также и среднеполярные компоненты. Установление равновесия между подвижной и стационарной фазами происходит быстро, так что без проблем может проводиться градиентное элюирование. Водные растворы проб намного чаще встречаются в аналитике, чем пробы в органических растворителях. Например, биологические соки, напитки, гальванические ванны и т.д. представляют собой водные растворы. Так как вода – это самый слабый элюент,



то возможен ввод на колонку водных растворов без какой-либо предварительной обработки (тем не менее рекомендуется фильтрация или центрифугирование).

В случае очень разбавленных растворов проб, которые могут встречаться, например, в медицине и биохимии, большие количества (100 мл и больше) водных растворов можно подавать на колонку насосом. При этом вещества пробы концентрируются в начале колонки, так как сила элюирования воды слишком мала. Когда сконцентрировано достаточное количество следового компонента, его элюируют подходящей подвижной фазой с добавлением ацетонитрила или метанола.

4.6.3. Оптимизация растворителя

Один из самых длительных этапов при разработке ВЭЖХ метода — это выбор правильного состава подвижной фазы. Аналитические лаборатории часто тратят много времени на то, чтобы разработать подходящее ВЭЖХ разделение. Большая часть этого времени будет использована для того, чтобы найти оптимальный состав подвижной фазы — вероятно, самую значимую переменную величину для достижения лучшего ВЭЖХ разделения.

Принципиально есть три подхода к решению проблемы оптимизации растворителей:

- **метод подбора** — пользователь проводит многочисленные эксперименты и выбирает условия для лучшего разделения;
- **постепенная оптимизация** — выбор условий основан на результатах предыдущих экспериментов. Таким образом, постепенно достигают оптимума;
- **интерпретирующий метод** — влияние изменения состава растворителей на время удерживания представляют в виде компьютерной модели. Оптимальная композиция растворителей предсказывается тогда математически.

Все три метода дают в итоге полезные сведения. Однако в случае первого и второго методов могут быть необходимы многочисленные эксперименты, и второй метод может вести к «локальному» оптимуму вместо лучшего «глобального» оптимума.

Третий метод, кажется, предлагает многообещающее решение, хотя нужно преодолеть некоторые трудности. Так как пики сдвигаются с изменением состава растворителей, они будут время от времени коэлюироваться. Поэтому необходимо следить за их положением. Спектры, полученные с помощью детектора с диодной линейкой, могут помочь в этом отношении. Когда встречается коэлюция, пики должны растягиваться, так что спектры могут рассчитываться и использоваться для распознавания компонентов. Особенно трудный случай, когда компоненты и их спектры неизвестны. В этой ситуации необходимо отточное хемометрическое программное обеспечение, которое делает возможным разрешение этого сложного спектра.

4.6.3.1. Компьютерная оптимизация

Четыре чаще всего используемых в обращеннофазовой ВЭЖХ растворителя — это метанол, ацетонитрил, тетрагидрофуран и вода или водный буфер. Возможные

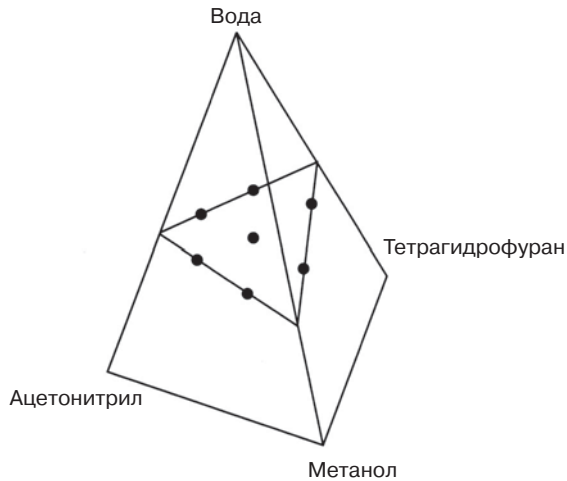


Рис. 4.22. Диаграмма смесей растворителей

комбинации этих растворителей можно описать как тетраэдр, как это представлено на рис. 4.22. Четыре вершины дают положение четырех чистых растворителей, ребра представляют бинарные, грани – тройные и пространство внутри тетраэдра – четверные смеси. В пределах тетраэдра можно определить плоскость, которая связывает друг с другом различные составы подвижной фазы, обладающие одной и той же элюотропной силой, и, таким образом, определить изоэлюотропную поверхность (составов подвижной фазы), для которой средняя величина k' одинакова, но селективность различна. Программное обеспечение помогает пользователю затем найти ту поверхность, которая лучше всего подходит для исследуемой пробы.

Вначале, используя градиент от воды или буфера к метанолу, определяют область (состава элюентов), обеспечивающих подходящий диапазон времен удерживания. На основании этих времен удерживания предсказывается состав смеси метанол/вода или метанол/буфер, которая в изократическом режиме дает приемлемый диапазон значений k' (например, от 0,5 до 10). Составы изоэлюотропных подвижных фаз ацетонитрил/буфер или тетрагидрофуран/буфер могут быть рассчитаны из факторов переноса, которые связывают элюотропную силу этого органического растворителя с метанолом.

Эти три бинарные смеси определяют положение изоэлюотропной поверхности внутри тетраэдра. Пригодность каждой бинарной смеси следует проверять экспериментально, так как используемые факторы переноса являются теоретическими величинами и поэтому не универсальны.

Затем проводят идентификацию пиков, моделируют удерживание и предсказывают оптимальное разделение. В различных точках изоэлюотропной плоскости записывают несколько наборов данных, полученных с детектором с диодной матрицей, обрабатывают их и результаты используют для предсказания оптимального разделения. Данные каждого для каждой точки (изоэлюотропной плоскости) оцениваются по тем или иным критериям, и выбирается лучшая хроматограмма.



Применение «более умных» хемометрических алгоритмов делает возможным разрешение и идентификацию неразделенных пиков. При этом речь идет о процессе, похожем на методы усиления изображений, которые применяются при редактировании спутниковых фотографий. Эта техника использует базу данных поглощение—длина волны—время, чтобы найти индивидуальные спектры пиков. Она основана на предположении, что матрица данных формируется из линейной комбинации индивидуальных спектров.

Если индивидуальные спектры известны, то матрицу можно найти относительно просто, сложнее выполнить обратную задачу. Суть метода состоит в разложении матрицы данных в произведение трех новых матриц: матрицы абстрактных спектров, матрицы абстрактных хроматограмм и диагональной матрицы, содержащей собственные значения. Последняя матрица показывает число имеющихся (на хроматограмме) компонентов (пики и фоновый режим). Из недиагональных матриц будут сконструированы новые хроматограммы через линейную комбинацию абстрактных хроматограмм.

Чтобы получать коэффициенты, которые используются для преобразования абстрактных хроматограмм в хроматограммы «наилучшего приближения», используется метод итераций, начиная с бесконечно узкого пика в заданном положении. Он используется для расчета коэффициентов, с которыми реконструируется улучшенная хроматограмма. После заданного количества итераций компьютер выводит лучшие реконструированные хроматограммы и спектры. Этот метод известен как «итерационный целевой факторный анализ» («Iterative target Transformation factor analysis»).

Для каждого пика на референтной хроматограмме подбирается математическая модель, описывающая его время удерживания в различных точках плоскости. Модель дает поверхность времен удерживания, которая описывает движение пиков при изменении состава растворителей. Результирующую функцию можно выбирать в зависимости от того, является ли, к примеру, необходимым минимальное время анализа или возможно более равномерное распределение пиков на хроматограмме.

Одно из главных преимуществ этого итеративного процесса состоит в том, что после сбора данных критерии оптимизации можно выбрать и изменить без проведения дополнительных экспериментов. «Теоретические хроматограммы» могут рассчитываться для всех пиков в пробе или только для их части. Таким образом, можно оптимизировать разделение только тех компонентов, которые представляют особый интерес.

4.6.4. Детектирование

Выбор детектора определяется чувствительностью и избирательностью, необходимых для решения аналитической задачи. Чувствительность, в свою очередь, зависит от физико-химических свойств анализируемых веществ — ультрафиолетовое поглощение, флуоресценция, электрохимический потенциал и показатель преломления. С другой стороны, определенную роль играет и чувствительность самого используемого устройства. Принцип измерения, который обеспечивает

наибольшую избирательность по отношению к нежелательным компонентам анализируемой смеси и необходимую чувствительность к целевым компонентам, выбирается исходя из свойств веществ, которые должны быть известны как можно более полно. Специфическая модификация функциональных групп анализируемых веществ до или после хроматографической колонки совершенно однозначно влияет на чувствительность и избирательность детектирования по поглощению ультрафиолетового света, флуоресценции или при электрохимическом детектировании.

4.7. ВЭЖХ детекторы

Большое число пользователей и широкий спектр приложений ВЭЖХ вызвали, естественно, появление большого числа фирм, производящих соответствующее оборудование. Возник большой, необозримый рынок, на котором новые фирмы успешно конкурируют с уже известными производителями [4.13]. Рынок быстро развивается с прогнозируемым на следующие годы приростом в области 15%. При этом дальнейшее развитие детекторов происходит в двух направлениях: с одной стороны, это совершенствование существующих моделей детекторов в плане повышения их чувствительности, стабильности и одновременного уменьшения объема кювет и, с другой стороны, это внедрение «умных» концепций, таких как, например, программирование параметров детектирования в процессе регистрации хроматограммы, выполняемых как на самом детекторе, так и с внешнего программирующего устройства центральной системы управления и сбора данных.

Примерная оценка доли применяемых в настоящее время различных типов детекторов, по данным исследований конъюнктуры рынка, приведена в табл. 4.4.

Под строкой «другие» в табл. 4.4 подразумеваются такие важные детекторы, как кодуктометрический детектор, а также такие системы, как комбинации ВЭЖХ-МС или ВЭЖХ-ИК, распространение которых на данный момент еще сравнительно невелико несмотря на их преимущества при качественном анализе, т.е. качественной интерпретации хроматографических пиков.

Таблица 4.4. Оценка доли использования самых важных типов детекторов

УФ спектрометр	30%
УФ спектрометр с диодной линейкой	15–20%
Одноручевой УФ спектрометр	10–15%
Рефрактометр	15%
Флуоресцентный детектор	10%
Электрохимический детектор	10%
Другие	5%

4.7.1. Общие требования к ВЭЖХ детекторам

Требования к ВЭЖХ детекторам определяются, с одной стороны, самой хроматографической системой, и прежде всего колонкой и ее свойствами, а, с другой стороны, вечным стремлением к быстрому и часто селективному обнаружению все более низких концентраций веществ. В области рутинного анализа самыми



важными требованиями к детектору являются высокая чувствительность и стабильность базовой линии.

С уменьшением диаметра аналитических колонок от 4,6 мм к 4–3 мм далее к 2 и 1 мм (а в капиллярной ВЭЖХ и еще меньше) возникла необходимость уменьшения объемов детектирования от традиционных 10 мкл до менее чем 1 мкл. Производители детекторов пытаются следовать этой тенденции, однако ее реализация для детекторов различных типов протекает с различным успехом.

Второе требование – возможно более короткое время анализа при одновременно высокой чувствительности обнаружения – подразумевает, с одной стороны, все более короткое время отклика детектора как следствие прохождения через кювету узких пиков – сегодня это примерно 20 мс – и, с другой стороны, возможно более низкий шум детектора. Эти требования – короткое время отклика и низкий шум – являются взаимоисключающими. Так как взаимная оптимизация этих параметров может происходить только в рамках решения конкретной проблемы, то детекторы нового поколения оснащаются сегодня в большинстве случаев ступенчатыми регуляторами времени отклика или, соответственно, постоянной времени (например, между 20 мс и 10 с).

На практике следует обращать внимание на то, что время отклика 20 мс никакой обычный самописец зарегистрировать не может. Такие короткие времена отклика нужны только при очень быстрых ВЭЖХ анализах с шириной пика до 1 с и, естественно, тогда переходят на электронный сбор данных или специальные быстрые самописцы.

В противоположность этому в гельхроматографии, а также в более сложных хроматографических задачах есть еще сегодня анализы, которые продолжаются час или более. Граница обнаружения для них определяется не только кратковременным шумом, но и долговременными колебаниями и отклонением базовой линии детектора. Дрейф нулевой линии является проблемой, прежде всего, для детекторов, измеряющих общие свойства веществ, например, показателя преломления, когда, как сигнал детектора, воспринимаются сравнительно небольшие изменения этого общего свойства. В этих случаях колебания температуры, давления, а также величины потока сказываются на дрейфе базовой линии несравнимо более сильно, чем, например, в ультрафиолетовом детекторе. УФ детектор при данной длине волны специфически «видит» только поглощение пробы, но не элюента, так что его с хорошим приближением можно считать нечувствительным к эффектам, оказываемым температурой или давлением на элюенты.

Все чаще требованием, предъявляемым к детекторам, становится определенный интеллект или же их интегрируемость в систему ВЭЖХ. Тем самым хотят достичь как полной автоматизации хроматографического анализа от ввода пробы до выдачи результатов, так и, прежде всего, настройки параметров детектора на оптимальное детектирование каждого из хроматографических пиков. Этого можно достичь с помощью внутреннего или внешнего программирования во времени таких параметров детектора, как чувствительность, постоянная времени, автоматическая коррекция базовой линии (между отдельными пиками) или, например, изменением рабочих длин волн у спектрометров.

Включение в ВЭЖХ систему компьютеров и соответствующих запоминающих средств позволяет, например, у спектрометров с диодной линейкой, масс-спектрометров и ИК-Фурье приборов получать спектры либо одновременно, либо последовательно, но в любом случае достаточно быстро (до нескольких спектров в секунду), что сильно повышает качественную информацию об анализируемой пробе. При наличии библиотек спектров тогда становятся возможными идентификация и определение чистоты пика и идентичности вещества.

4.7.2. Детекторы УФ- и видимого диапазона

Детекторы УФ- и видимого диапазона во всех их вариантах являются сегодня наиболее распространенным видом детекторов ВЭЖХ. Принцип действия основывается на ослаблении луча монохроматического света при прохождении через проточную кювету, заполненную веществом пробы. Величина ослабления зависит от коэффициента поглощения вещества ϵ , концентрации компонента пробы в подвижной фазе c и толщины слоя d . Это ослабление света описывается безразмерной величиной поглощения E , которая выражается через вышеназванные факторы по закону Бугера–Ламберта–Бера:

$$E = \epsilon c d.$$

Чтобы получать возможно более высокую чувствительность, оптический путь d через кювету нужно сделать настолько большим, насколько это возможно. С другой стороны, объем кюветы должен быть мал соответственно количеству проходящего потока. При этом типичные размеры кюветы – это толщина слоя 10 мм при объеме примерно 8 мкл.

Детекторы УФ- и видимого диапазона относительно невосприимчивы к изменениям общих свойств элюатов при колебаниях температуры и потока или, например, состава элюата при градиентном элюировании (пока сам элюент не поглощает свет). Эта индифферентность одновременно ограничивает применимость фотометрии: она позволяет обнаружить в элюате только такие компоненты, которые поглощают свет при больших длинах волн, чем сам элюент. Это значит, что даже в метаноле, воде или ацетонитриле (или смеси этих элюентов) можно обнаружить только те соединения, которые поглощают свет при длинах волн больше 190 нм, поэтому нижняя граница рабочей области всех доступных сегодня фотометрических детекторов ограничена 190 нм.

Поглощение при длинах волн, больших чем 190 нм, наблюдается у соединений тогда, когда в их молекуле есть как минимум одна из следующих групп:

- двойная связь рядом с атомом, несущим неподеленную пару электронов (например, виниловый эфир $C=C-O-C$),
- гетероатомы: бром, йод или сера,
- карбонильная группа $-C=O$,
- сопряженные двойные связи $-C=C-C=C-$
- или ароматическое кольцо.

Эти группы неодинаково поглощают свет и, кроме того, при разных длинах волн. На интенсивность поглощения и положение максимума поглощения влияют так-

же соседние группы атомов в молекуле. Ароматические вещества обладают очень высокими коэффициентами поглощения и обеспечивают вследствие этого высокую чувствительность детектора, кетоны с функциональными $-C=O$ группами имеют сравнительно низкий коэффициент поглощения и детектор обладает по отношению к этим соединениям более низкой чувствительностью. Алифатические соединения без функциональных групп не могут быть обнаружены ультрафиолетовым детектором, так как эти вещества поглощают свет только в области ниже 190 нм.

Как источник света в детекторе УФ- и видимого диапазона используются ртутные лампы пониженного давления, дейтериевые лампы и вольфрамовые лампы. Ртутные лампы пониженного давления испускают свет при 253,7 нм. Более слабые излучения при других длинах волн должны тщательно отфильтровываться, так как иначе сужается линейная область детектора. Детекторы с фиксированной длиной волны до 20 раз более чувствительны, чем детекторы с переменной длиной волны. Сильным поглощением при 254 нм обладают все ароматические молекулы. Также можно детектировать вещества с карбонильными и похожими группами и изопреноидные структуры со многими сопряженными двойными связями, если максимум поглощения лежит не слишком далеко от 254 нм. Если лампа снабжена фосфоресцирующим слоем, то такие детекторы можно применять также при некоторых других длинах волн.

Дейтериевые лампы дают непрерывный ультрафиолетовый спектр (примерно до 360 нм). Длину волны, при которой хотят проводить определение, можно выбирать соответственно решаемой задаче. Как показано на рис. 4.23, монохроматический свет через оптическую решетку и щель монохроматора направляется на проточную кювету детектора и далее к фотоумножителю.

Такие детекторы менее чувствительны, чем детекторы с фиксированной длиной волны, т.е. уровень шумов у них выше, что, отчасти, компенсируется тем, что

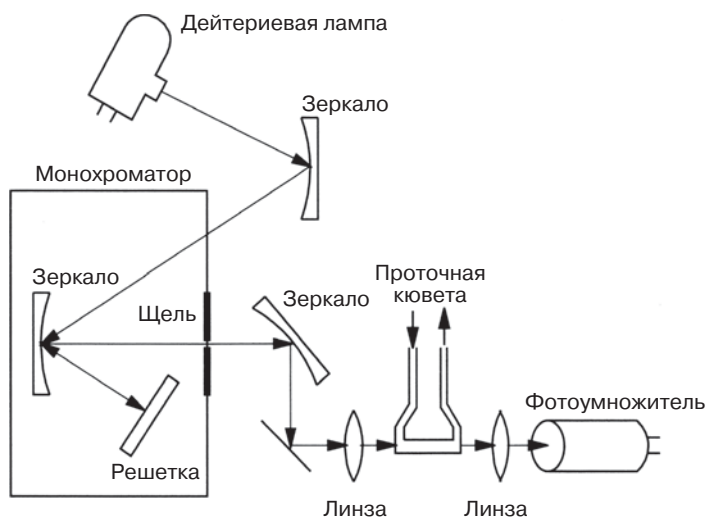


Рис. 4.23. Оптическая система однолучевого УФ детектора с переменной длиной волны

детектор можно настроить на длину волны максимума поглощения определяемого вещества.

Вольфрамовые лампы выпускают для ближней ультрафиолетовой и видимой областей (примерно от 340 до 850 нм). Они — идеальное дополнение к дейтериевым лампам. Как у дейтериевой лампы, так как и у вольфрамовой лампы ширина спектральной полосы не должна быть настолько узкой, как это имеет место в регистрирующих спектрометрах. Обычно ширина полосы составляет примерно 10 нм, т.е. отфильтрованный свет не монохроматический, а охватывает область, например, от 280 до 290 нм при выбранной длине волн 285 нм. Это имеет то преимущество, что луч имеет большую интенсивность и тем самым увеличивается чувствительность детектора. Однако ширина диапазона не может быть слишком большой, так как иначе сужается линейная область детектора.

Чтобы в полной мере использовать чувствительность сегодняшних детекторов УФ- и видимого диапазона в области коротких длин волн (от 190 до 250 нм), рекомендуется брать хорошо очищенные элюенты. К тому же реагенты специального качества для ВЭЖХ сегодня доступны коммерчески. Рекомендуется дегазировать элюенты с помощью гелия или, по крайней мере, азота, чтобы уменьшить собственное поглощение элюентов, обусловленное присутствием кислорода.

Едва ли можно полностью избежать дрейфа базовой линии при градиенте растворителя, даже если сами компоненты элюента свет не поглощают. Это связано с изменением коэффициента преломления, которое при потерях отражения на границе фаз окно кюветы/элюент вызывает мнимое поглощение и, вместе с тем, изменение базовой линии. Конструктивно этот эффект можно минимизировать, и оптика более новых приборов устроена соответствующим образом. Дополнительные возможности представляет микропроцессорная техника, которая позволяет записывать базовую линию для пустого градиента и вычитать ее из последующих хроматограмм.

Сегодня чувствительность самых последних моделей детекторов УФ- и видимого диапазона и детекторов с постоянной длиной волны настолько высока, что существенного дальнейшего повышения ожидать уже не стоит. Чувствительность новейших детекторов составляет (2–5) 10^{-5} оптических единиц поглощения, что довольно хорошо соответствует теоретически предельно достижимой величине (следует из статистики фотонов) для ширины полосы от 5 до 10 нм при 250 нм с кюветами диаметром 1 мм и длиной 10 мм с дейтериевой лампой. Так что для этих приборов нет теоретических предпосылок для существенного повышения чувствительности. Тем не менее, это возможно при использовании импульсных ламп, дающих более мощный световой поток. Первые устройства такого типа недавно появились на рынке.

Стандартная область измерения простирается от примерно 0,001 до 2,0 оптических единиц поглощения (ОЕП). При поглощениях более 1 ОЕП, в общем случае, наблюдается отклонение от линейности, что будет мешать при препаративных разделениях. Также следует учитывать, что, как правило, по мере службы прибора доля рассеянного света монохроматоров в спектрофотометрах возрастает, что ухудшает линейность прибора в верхней области поглощения (и только там!).



Стандартной является операция автоматического «обнуления» прибора, т.е. установка базовой линии на ноль и отметка «сигнал маркера» о начале измерения при нажатии соответствующей кнопки. Обе операции у большинства приборов можно выполнить также внешним замыканием контакта. Полезное для многих приложений свойство некоторых новых спектрофотометров — это возможность временного программирования таких важных параметров устройств, как длина волн, область измерений, автоматическое обнуление и т.п., или возможность внешнего управления этими параметрами, что позволяет тогда полное системное интегрирование таких приборов. При временной программной установке длин волн во время текущей хроматограммы для детектирования используются разные длины волн. Это дает то преимущество, что для каждого вещества достигается оптимальная чувствительность по поглощению света.

Если анализируются пробы с качественно точно известным составом, то данный метод позволяет определять химическое соединение количественно по площади пика и качественно по времени удерживания. Метод не работает, если вещества должны определяться в такой сложной матрице, как это имеет место в экологии, в аналитике пищевых продуктов и в клинической химии, а также если нужно перепроверить идентичность вещества. Простой расчет показывает нам, что существует 10^7 известных хроматографируемых соединений, из которых, тем не менее, по времени удержания на хроматограмме могут отличаться только 10^2 . Следовательно, для вышеупомянутых областей приложения не только теоретически, но также практически высока вероятность того, что под одним пиком могут скрываться несколько веществ.

Если вопреки ожиданиям пик на хроматограмме соответствует не химическому соединению, а содержит дополнительные нежелательные или неизвестные соединения, то говорят о загрязнении пика. Поэтому необходим метод, позволяющий быстро и без больших издержек обнаружить загрязнения пика. Возможные действия для этого:

- одновременное измерение при нескольких длинах волн и расчет соответствующего отношения интенсивностей или
- измерение УФ- и видимых спектров веществ, которые проходят через точную кювету детектора.

Обычные спектрофотометры предлагают возможность ручного или автоматического изменения длин волн посредством механической перестановки позиций конструктивных элементов. В зависимости от типа прибора меняется либо спектральная область, которая падает на твердо установленный светоприемник, либо изменяется его собственное положение.

Запись спектров поглощения методом «сканирования», т.е. механическое перемещение по определенной области длин волн, продолжается от нескольких секунд до нескольких минут — в зависимости от типа сканирующей техники и ширины, выбранной области длин волн. Так как элюируемый пик за это время заметно перемещается в измерительной ячейке или даже полностью покидает ее, то при записи спектров должны быть приняты специальные меры. Для этого поток элюента в ячейке детектора останавливается. Запись спектров методом «останов-

ленного потока» («Stopped-flow») требует очень много времени, так как для каждой записи спектра элюированного вещества должна быть получена новая хроматограмма. При остановленном потоке вещества диффундируют, вследствие чего в колонке они снова перемешиваются.

Без остановки потока спектр измеряют на восходящей или нисходящей части пика, где концентрация со временем изменяется приблизительно линейно и затем математически корректируется. Такая техника, тем не менее, требует относительно много времени и едва ли поддается автоматизации, что ограничивает ее рутинное использование.

Рис. 4.24 показывает схематическое устройство детектора, у которого длина волны устанавливается механическим позиционированием фотодиода. Запись спектров происходит ступенчатым перемещением фотодиода по сканируемой области длин волн.

Полезное для многих приложений свойство некоторых новых спектрофотометров – это возможность временного программирования таких важных параметров устройств, как длина волн, область измерений, автоматическое обнуление и т.п. или возможность внешнего управления этими параметрами, что позволяет тогда полное системное интегрирование таких приборов. Возможность свободного выбора длин волн от хроматограммы к хроматограмме или же их измене-

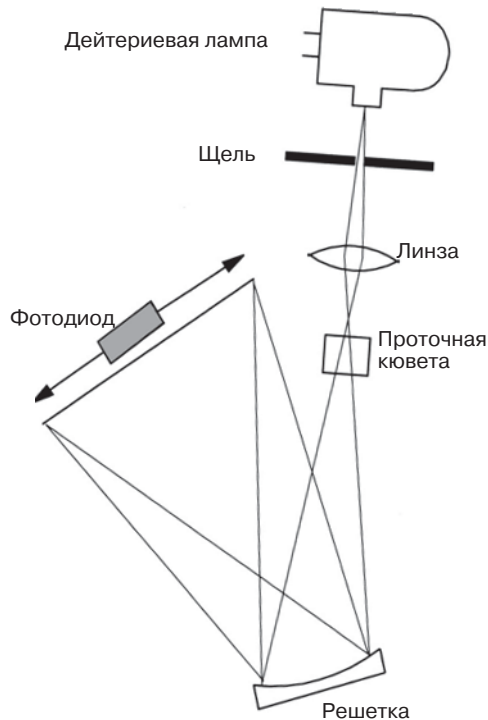


Рис. 4.24. Схема детектора УФ- и видимого диапазона, у которого изменение длины волны осуществляется за счет механического перемещения подвижного фотодиода

ние в процессе одной и той же хроматограммы необходимо, чтобы можно было оптимизировать параметры детектирования для выполняемой задачи.

4.7.3. Детектор с диодной линейкой

По сравнению с классическими программируемыми спектрофотометрами детекторы с диодной линейкой хотя и обладают более низкой чувствительностью предлагают большие возможности для программирования и системного интегрирования. Первоначально недостатком диодных линеек по сравнению с обычным ультрафиолетовым детектором была значительно меньшая чувствительность и сложность в обслуживании. Эти недостатки устранены у всех современных детекторов с диодной линейкой [4.14]. Дополнительно к упомянутым свойствам диодные линейки могут записывать спектры за очень короткое время, например, 20 мс. С помощью компьютеров с большим объемом памяти двумерное изображение хроматограммы «поглощение–время» можно расширить на третье измерение «длина волны». Таким образом, хроматограмма наблюдается одновременно при многих длинах волн [4.15].

Если, как показано на рис. 4.25, заменяют подвижные фотодиоды большим количеством близко лежащих жестко установленных фотодиодов – диодной линейкой, то свет определенной длины волны или определенной области длин волн попадает на определенный фотодиод. В соответствии с этим принципом при изменении длины волны для измерения интенсивности света будут использованы

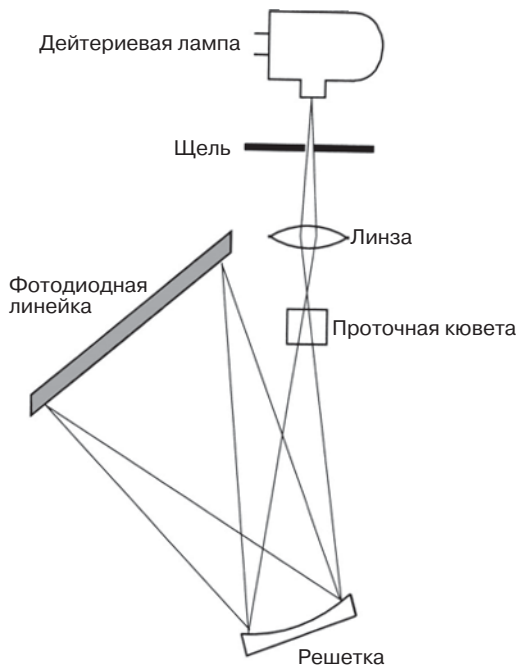


Рис. 4.25. Схема устройства детектора с диодной линейкой. Подвижные фотодиоды заменены фотодиодной линейкой

лишь другие фотодиоды, и никакие части механически больше не перемещаются. Для записи спектра последовательность сигналов диодов очень быстро считывается и сохраняется в компьютере.

При этом скорость записи ограничивается по существу только лишь скоростью сбора и обработки данных. Если все фотодиоды по очереди постоянно опрашиваются в очень быстром временном цикле, то в любое время получают полный спектр поглощения пика: длина волны выступает как третье измерение наряду со временем и поглощением. Если записывают сигнал только одного фотодиода, то наблюдают изменение поглощения в зависимости от времени для определенной длины волны – как для классической хроматограммы [4.16].

Детектор с диодной линейкой измеряет поглощения не только при одной или нескольких длинах волн, но и во всем спектральном диапазоне. Получаемая при этом информация открывает абсолютно новые возможности для количественной оценки и контроля:

- проверка чистоты пика по спектрам,
- идентификация пика по спектрам сравнения,
- выбор оптимальной длины волны для детектирования различных веществ.

Неразделенные пики можно идентифицировать и проверить непрерывным сканированием фотодиодной линейкой без дополнительных измерений. При нормировании пика проводится вычисление отношения величин поглощения пика при двух или нескольких длинах волн. У обычных УФ детекторов необходимо измерение, по крайней мере, при еще одной длине волны, чтобы получить отношение поглощений (*Ratiogramme*) для каждого компонента. Изменение величины отношения указывает на совместное элюирование следующего компонента. У детектора с диодной линейкой это отношение вычисляется автоматически в режиме *Ratio-Plots*.

Другое преимущество многоканального детектора состоит в том, что вся спектральная область исследуется одновременно. Информация, получаемая при одновременном детектировании на многих длинах волн, часто представляется в форме трехмерного графика. При этом нужно учитывать, что УФ спектры не так характерны, как, например ИК или масс-спектры. Тем не менее, с привлечением численных методов полученные спектры, после незначительной коррекции, могут использоваться для распознавания веществ. Чем лучше спектральное и цифровое разрешение используемых спектров, тем надежнее могут применяться численные методы и тем легче использовать для идентификации обычно небольшие различия в форме и положении полос. Это гарантируется в первую очередь сильной светооптикой, которая дополняется электроникой, способной различать сигналы, близкие к уровню шумов [4.17]. Этим гарантируется то, что будут записаны действительно реальные спектры, а не «цифровые скачки» [4.18].

Спектроскопия знает различные способы сглаживания шумов. Самый простой способ – это увеличение времени регистрации или для спектрометров с диодной линейкой увеличение числа записанных спектров. Этот способ в случае хроматографии нельзя применять непосредственно, так как здесь работают во временном интервале, и при использовании этого метода можно было бы ожидать искажений вследствие изменения концентрации.



При коротких временах удерживания полуширина пика составляет от 2 до 5 с. Чтобы полностью охватить эти быстрые пики, требуется очень высокая скорость считывания, которая у многоканальных спектрометров составляет 50 Гц. Таким образом, каждые 20 мс измеряется один спектрспектр, и из полученных спектров в режиме онлайн конструируется хроматограмма при определенной длине волны. С такой скоростью считывания, во-первых, возможна количественная обработка пиков, имеющих полуширину на уровне нескольких секунд, кроме того, нет опасности искажения спектров, записанных «онлайн». Здесь также важно, что детектирование может проводиться с высокой чувствительностью, так как за этот короткий временной интервал едва ли есть возможность для сглаживания и усреднения спектров по времени.

Благодаря большому массиву данных экспериментатор получает максимальную информацию о поглощении элюента, выходящего из колонки, в ходе анализов, тем не менее, ему было бы трудно выделить из этого массива важную для него информацию. Только если эти методы поддерживаются не только в диалоговом, но и в автоматическом режиме сохранения, они могут применяться в рутинном анализе. Поэтому цель автоматической обработки данных должна состоять в том, чтобы облегчить эту работу пользователю или, где это возможно, устранить ее полностью. Детектор с диодной линейкой должен быть полностью интегрирован с программой управления и обработки данных ВЭЖХ, тогда высокая ценность документации и защита результатов реализуются без дополнительных затрат на персонал.

Перед анализом пользователь может свободно выбрать до восьми длин волн для одновременного детектирования. Любая из этих длин волн может использоваться также как длина волны сравнения. Измеренное при этом поглощение автоматически вычитается из поглощения при других длинах волн. Этот метод значительно сокращает флуктуации базовой линии, которые возникают из-за мешающих факторов (например, колебаний температуры), которые никак не связаны с используемыми длинами волн.

Используя восемь различных длин волн, можно получать до восьми независимых сигналов, причем длины волн могут быть произвольно запрограммированы во времени, что соответствует восьми многоканальным детекторам. Параллельно этому спектры поглощения могут либо сохраняться, либо выводиться на экран. Момент записи спектров определяется либо оператором, либо автоматически самим устройством. Пользователь может решать, должны ли быть записаны спектры для максимумов пиков или для максимумов и точек перегиба пиков. Записанные УФ спектры пиков автоматически сравниваются со спектрами из библиотеки спектров. Если спектры совпадают, то идентифицированные пики на хроматограмме помечаются названием компонента наилучшего соответствия, как, например, представлено на рис. 4.26.

Пик считается идентифицированным тогда, когда время удерживания и совпадение спектров превосходят минимальный критерий, который устанавливается пользователем. Чтобы удостовериться, что нет никаких неразрешенных пиков, «контроль чистоты» проводится перед каждым библиотечным поиском. При этом спектры пиков, полученные в точках перегиба восходящей и нисходящей частей пика и в максимуме пика, нормируются и сравниваются [4.19].

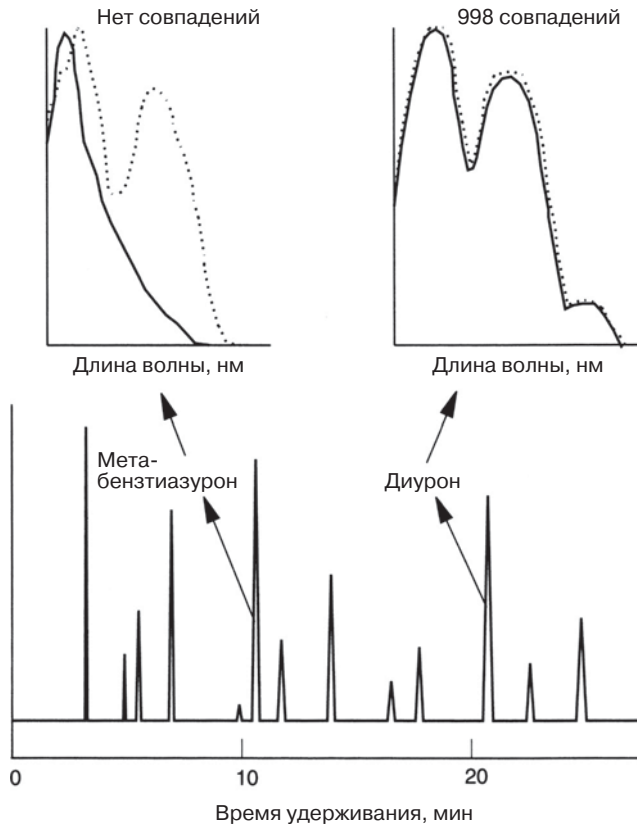


Рис. 4.26. Сравнение спектров и идентификация по библиотекам УФ спектров

Хроматограмма наблюдается одновременно при многих длинах волн. Число этих длин волн определяется числом фотодиодов, оно обычно лежит между 512 и 1024 диодами. У представленных на рынке многоканальных детекторов различные подходы к обработке принципиально больших объемов данных. Некоторые детекторы способны работать как независимые устройства (часто расширяя, однако, свои возможности за счет внешних компьютеров), другим для работы нужен лабораторный компьютер. Цена таких приборов значительно снизилась, так что сегодня они доступны уже примерно за 12,5 тысяч евро.

Другое преимущество детектора с диодной линейкой состоит в возможности численной оценки неразделенных пиков. В общем случае, в хроматографии для расчета площади пиков, не разрешенных до базовой линии, пики разделяют, проводя перпендикуляр в минимуме между пиками. В детекторах с диодной линейкой с помощью соответствующей программы интеграл вычисляется для всех длин волн за время, ограничивающее весь (неразделенный) пик.

Этот интеграл содержит как качественную, так и количественную информацию о рассматриваемом пике. Качественная оценка дается спектрам в каждой временной точке пика, количественная оценка содержится в величине площади пиков, найденных при постоянной скорости потока. Таким образом, плохо или

вовсе не разрешенные пики могут количественно определяться при мультикомпонентном анализе [4.20].

4.7.4. Дифференциальный рефрактометр

Согласно английскому термину «refractive index» (показатель преломления) эти детекторы называются также RI детекторы, в русском – рефрактометрические детекторы РМД. Детекторы по показателю преломления неселективны и часто используются как дополнение к ультрафиолетовым детекторам. Они регистрируют все вещества, у которых показатель преломления другой, чем у чистой подвижной фазы. Сигнал тем больше, чем больше различаются показатели преломления у пробы и элюента. Однако в целом РМД примерно в 1000 раз менее чувствительны, чем ультрафиолетовые детекторы.

Сегодня дифференциальные рефрактометры для ВЭЖХ работают почти исключительно по принципу оптического отклонения: его ячейка разделена на две части кривой перегородкой. Одна часть заполняется раствором сравнения, другая – элюентом. Отклонение луча света изменяется, если показатель преломления измерительной ячейки отличается от показателя преломления ячейки сравнения, то есть когда через рабочую ячейку элюируется компонент пробы (рис. 4.27).

Свет проходит через диафрагму: дважды (туда и обратно) через линзу и дважды через двойную ячейку. Если в измерительной ячейке находится чистая подвижная фаза, то с помощью подвижного стеклянного диска луч света устанавливается точно на щель перед фотоэлементом. При изменении показателя преломления в измерительной ячейке свет отклоняется иначе, и через щель поступает меньше света. Сопротивление фотоэлемента изменяется, что ведет к изменению напряжения в мостовой схеме и, таким образом, к появлению сигнала.

Изменение показателя преломления в зависимости от концентрации вещества в растворе очень мало и поэтому оно полностью нивелировалось бы температурной зависимостью показателя преломления самого элюента, если бы, с од-

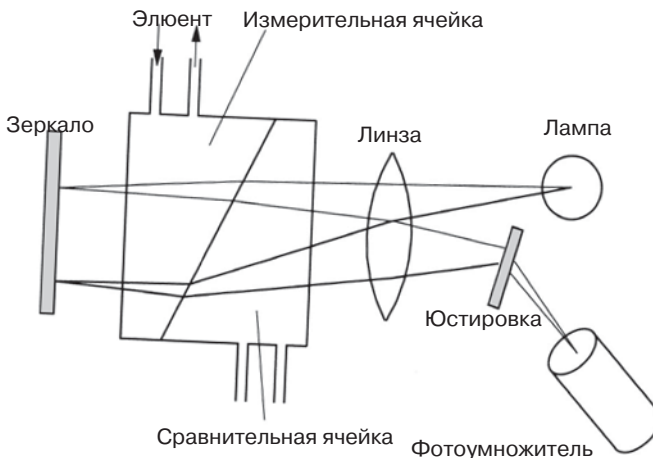


Рис. 4.27. Рефрактометр оптического отклонения

ной стороны, не применялась описанная выше дифференциальная схема измерения и, с другой стороны, если бы не производилось тщательное термостатирование элюента во встроенном термостате. Термостатирование содержимого кювет должно проводиться таким образом, чтобы различие в температуре не превышало примерно 10^{-4} °С. Постоянство температуры всего оптического блока РМД обеспечивается либо водяным термостатом, либо непосредственно электронным регулированием заданной температуры, которая обычно выбирается выше комнатной.

Нулевая линия устанавливается, как правило, оптическим сдвигом луча света, например, поворотами плоскопараллельной кварцевой пластинки в луче света. Очень маленькие повороты пластинки подобны шумам прибора, и их, даже при высоком передаточном числе регулятора, удается подобрать, только имея большой опыт. Поэтому некоторые производители уже переходят к тому, чтобы вручную проводить только грубое «обнуление», а затем проводить точное автоматическое электронное «обнуление» («Auto-Zero»), управление которым часто может осуществляться от внешних устройств. Новинкой некоторых приборов является наличие вентиля промывки кюветы сравнения, позволяющей проводить заполнение или промывку канала сравнения.

4.7.5. Флуоресцентный детектор

С флуоресцентным детектором в элюатах могут быть обнаружены вещества, которые флуоресцируют при облучении светом большей частью в близкой ультрафиолетовой области и излучение которых находится в более длинноволновой области. Длины волн возбуждения либо определяются используемой лампой (ртутная лампа высокого давления), либо, при использовании дейтериевых ламп, могут устанавливаться с помощью монохроматора. Излучение флуоресценции происходит во всех направлениях, но измеряется в направлении перпендикулярном к направлению луча возбуждения. В этом случае свет лампы возбуждения не падает на детектор. Рассеянный свет на длине волны возбуждения должен устраняться подходящими фильтрами.

Чувствительность флуоресцентного детектора превосходит чувствительность детектора по поглощению примерно в 1000 раз при более высокой избирательности. Значительное повышение чувствительности флуоресцентного детектора определяется принципом измерения, заложенным в приборе. При измерении по поглощению на фотоумножитель попадает свет высокой интенсивности, которая ослабляется за счет сорбатов, поступающих в измерительную ячейку. Ограничением является то, что при этом измеряется разница в интенсивности двух высокоинтенсивных лучей. Напротив, в случае флуоресценции речь идет об абсолютном измерении интенсивности света. Если в измерительной ячейке нет флуоресцирующего вещества, то никакой свет на детектор не падает. Очень небольшое излучение флуоресцирующего соединения можно детектировать благодаря большому усилению сигнала.

Самая современная электроника спектрометров позволяет получать не только высокую чувствительность, но и облегчает обслуживание прибора. Длины волны возбуждения, постоянная времени и установка «нуля» могут программировать-

ся во времени. Однако, к сожалению, имеются только определенные классы соединений, которые проявляют флуоресценцию.

4.7.5.1. Флуоресценция и фосфоресценция

Обсуждая поглощение света, мы должны несколько подробнее рассмотреть превращения возбужденных молекул. Как во всех системах, которые не находятся в энергетическом равновесии с окружающей средой, для возбужденных молекул можно также ожидать, что их время жизни будет ограничено и что по прошествии определенного времени, излучая энергию, они снова вернуться в основное состояние. Если этот переход из возбужденного состояния A^* в основное состояние A происходит таким образом, что энергия возбуждения ΔE возвращается излучением света соответствующей частоты ν , то говорят о флуоресценции.



Вероятность излучательных переходов, которые соответствуют нормальным «разрешенным» полосам поглощения органических соединений, настолько велика, что среднее время жизни этих возбужденных состояний лежит от 10^{-9} до 10^{-1} с. Время же самого перехода, вызванного поглощением энергии, составляет всего лишь 10^{-15} с.

Если учитывать только возбуждение электронов, то следовало бы ожидать, что длина волны флуоресценции будет точно совпадать с длиной волн поглощения, как это наблюдается для излучения возбужденных атомов (резонансная флуоресценция). На практике, однако, при флуоресценции молекул в большинстве случаев наблюдают длинноволновое смещение относительно полосы поглощения (правило Стокса), которое вызывается участием атомных колебаний в рассеивании энергии.

В противоположность излучаемой энергии, которая при флуоресценции всегда должна быть меньше из-за смещения Стокса, квантовый выход флуоресценции для всех соединений должен был бы быть равен единице, если бы никакие другие процессы, такие как излучение света, не участвовали бы в деактивации возбужденных состояний, так как в этом случае для каждого поглощенного кванта света также должен был бы испускаться один квант света. Фактически у большинства химических соединений флуоресценцию вообще не наблюдают. Среди разнообразных вариантов безызлучательной деактивации нужно различать внутри- и межмолекулярные процессы. К первым принадлежат «соударения второго рода», в которых при столкновении с другой молекулой энергия возбуждения переносится на эту молекулу как энергия поступательного движения или энергия колебаний («тушение флуоресценции»). Для большинства вообще не флуоресцирующих органических соединений деактивация первого возбужденного состояния происходит вследствие так называемых процессов предиссоциации, т.е. расщепления более слабых связей в той части молекулы, которая поглощает свет. Это естественно возможно, только если энергии возбуждения достигают величины энергии разрыва соответствующих связей.

Флуоресценция встречается только у тех органических соединений, которые содержат π -электроны,

так как эти соединения вследствие специфических свойств π -электронов требуют особенно низкой энергии для оптического возбуждения и в то же время они обладают настолько стабильной системой связей, что при возбуждении диссоциации связей не происходит.

Самую большую группу флуоресцирующих органических соединений представляют изо- и гетероциклические соединения с ароматическими системами. Почти все ароматические углеводороды отличаются сильной флуоресценцией, которая, тем не менее, часто значительно снижается с введением заместителей. Особенно такие заместители, как карбоксильные кислоты, нитро- и SH-группы и им подобные почти полностью «тушат» флуоресценцию ароматических углеводородов.

Короткоживущая флуоресценция со средним временем жизни от 10^{-8} с — это не единственный вид эмиссии, который можно наблюдать после фотовозбуждения органических соединений. В особых условиях для многих органических веществ наблюдается излучение, которое отличается от флуоресценции прежде всего тем, что ее время жизни достигает нескольких секунд. Так как столь продолжительное время жизни в обычных условиях возбуждения невозможно, то эта так называемая фосфоресценция должна быть отнесена к метастабильному состоянию, в которое может перейти без излучения молекула из первичного возбужденного состояния.

В случае нормальных основных и возбужденных состояний органических соединений речь идет о синглетных уровнях S , где нет неспаренных электронов, но вместе с тем существует обладающий еще более низкой энергией триплетный уровень T . Такие триплетные уровни содержат два электрона с параллельными спинами. Переходы между синглетными и триплетными уровнями происходят с изменением спина и обычно «запрещены». Маловероятный процесс обращения спина может происходить только через так называемое спин-орбитальное спаривание, т.е. взаимодействие спина электрона с его орбиталью.

При этом нужно делать различие между двумя типами фосфоресценции: высокотемпературной, или α -фосфоресценцией, которая преимущественно протекает при повышенных температурах и спектрально совпадает с флуоресценцией, и длинноволновой низкотемпературной, или β -фосфоресценцией, которая наблюдается только при низких температурах.

Интерпретация явлений флуоресценции и фосфоресценции представлена на рис. 4.28 с помощью схемы термов Яблонского.

- 1: При поглощении света из основного состояния S_0 сначала возникают возбужденные синглетные состояния (S_1 , S_2 и т.д.) со спаренным спином (электронная конфигурация с левой стороны рис. 4.28). При этом ВЗМО означает «высшая занятая молекулярная орбиталь», а НСМО — «нижняя свободная молекулярная орбиталь».
- 2: Это переход соответствует возможному случаю резонансной флуоресценции, при котором длины волн возбуждения и испускания равны.
- 3: Это переход является самым часто наблюдаемым случаем флуоресценции, при котором сначала вследствие соучастия атомных колебаний происходит безызлучательная деактивация с переходом на более низкоэнергетический уровень, что и смещает флуоресценцию в область больших длин волн относительно полосы поглощения.

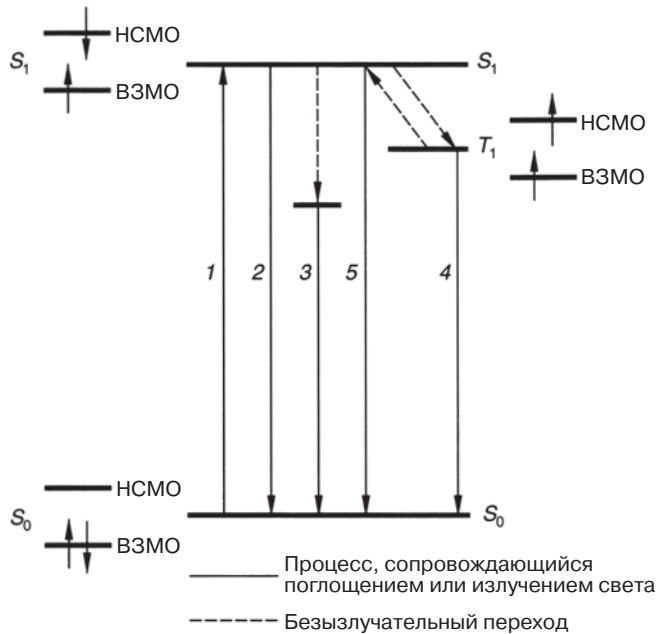


Рис. 4.28. Упрощенная схема Яблонского

- 4: При этом переходе речь идет о β -флуоресценции, при которой возбужденная молекула в синглетном состоянии S_1 переходит с потерей излучения в низкоэнергетическое метастабильное триплетное состояние T_1 . Переход из этого долгоживущего метастабильного состояния в основное состояние обладает лишь небольшой вероятностью. Излучение из-за меньшего различия между термами является более длинноволновым, чем флуоресценция.
- 5: При α -флуоресценции молекула за счет поглощения термической энергии снова возвращается из метастабильного состояния T_1 в возбужденное состояние S_1 , за которым следует обычная флуоресценция, которая из-за пребывания возбужденной молекулы в метастабильном состоянии T_1 по времени смещена относительно нормальной флуоресценции.

4.7.5.2. Применение флуоресцентного детектора

Возможно более мощный источник света направляет свет через монохроматор в проточную кювету. «Вторичный свет», излучаемый возбужденным флуоресцирующим веществом, проходит через фильтр или решетку монохроматора к светочувствительному детектору, который дает концентрационнозависимые показания. Связь между интенсивностью флуоресценции и концентрацией вещества такова:

$$F = I_0 2,3 \varepsilon c d \Phi,$$

где F – полная интенсивность флуоресценции (кванты/с); I_0 – интенсивность возбуждающего света (кванты/с); ε – молярный коэффициент экстинкции; c – кон-

центрация раствора; d — оптический путь через слой раствора; Φ — квантовый выход для измеряемого вещества.

Так как I_0 и d являются приборными константами, а E и Φ — постоянными для вещества величинами, измеряемая относительная интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации вещества в растворе.

Флуоресцентный детектор очень специфичен, при его использовании нужно принимать еще больше мер предосторожности, чем, например, для УФ детекторов. Квантовый выход флуоресценции зависит в основном от всех параметров элюирования, как, например, рН, температура, вязкость, от одновременного элюирования нефлуоресцирующих соединений. Особенно рекомендуется применение колоночных термостатов, так как воспроизводимые результаты получаются только в изотермических условиях. Так как флуоресцентный выход растет с понижением температуры, то с помощью охлаждения колонки можно заметно снизить границу обнаружения вещества.

Некоторые вещества могут подавлять или полностью тушить флуоресценцию. Поэтому условия работы при количественном анализе должны быть по возможности хорошо определены и постоянны. Так как поглощение возбуждающего света следует закону Ламберта—Бера, то линейная зависимость между интенсивностью флуоресценции и концентрацией пробы выполняется только при достаточно низких концентрациях. Поэтому детектор по флуоресценции не подходит для количественных препаративных задач, а предназначен для целей высокочувствительных аналитических определений.

Значение детекторов флуоресценции растет, поскольку для веществ с сильной флуоресценцией они обладают очень высокой чувствительностью, которая во многих случаях больше, чем при использовании ультрафиолетовых детекторов. Возбуждение ароматических соединений эффективнее всего в области длин волн от 200 до 280 нм. Для сульфата хинина, популярного стандарта для измерений флуоресценции, граница обнаружения лежит около 1 ppb. Особое применение находит детектор флуоресценции при анализе полициклических ароматических углеводородов (ПАК).

С несколько большими трудозатратами детектирование по флуоресценции может быть применено также для некоторых других классов соединений, которые сами не флуоресцируют, но для которых до или после колонки могут быть получены флуоресцирующие производные. Перевод во флуоресцирующие производные позволяет существенно повысить чувствительность обнаружения этих соединений. Так, например, для аминокислот, алкалоидов, катехоламинов в форме данзил-производных (1-диметиламинонафталин-8-сульфокислота) предел обнаружения с детектором по флуоресценции снижается в нанограммовую область. В противоположность предколоночной дериватизации разделение соединений, модифицированных до колонки, удается проводить без каких-либо затруднений, хотя молекулярные свойства производных вследствие дериватизации и становятся очень близкими. И другие важные классы веществ, такие как сахара, белки, жирные кислоты и афлотоксины, можно переводить во флуоресцирующие соединения и, таким образом, повышать чувствительность их определения [4.21].



За применение флуоресцентной спектроскопии как метода детекции в ВЭЖХ говорят следующие положения, которые всецело свойственны флуоресцентной спектроскопии:

- высокая чувствительность, как правило, в 10–1000 раз выше, чем в абсорбционной спектроскопии,
- высокая селективность за счет выбора для измерений двух длин волн: линии возбуждения и линии испускания,
- дифференциация неизвестных смесей веществ путем варьирования комбинаций длин волн,
- использование других спектроскопических эффектов, таких как фосфоресценция, поляризация и спектроскопия с использованием дифференцирования и т.д.

Геометрия проточной кюветы для флуоресцентного детектирования имеет особое значение. Проточные кюветы имеют маленький объем примерно – 5 мкл и особенно маленькую толщину слоя – 1 мм, чтобы собственное поглощение в кювете (тушение) было незначительным. По закону о питьевой воде (TVO) полициклические ароматические углеводороды (ПАК), подлежащие определению из-за их канцерогенного действия, могут быть обнаружены с высокой чувствительностью детектором по флуоресценции, снабженным программированием переключения длин волн [4.22].

4.7.6. Электрохимический детектор

Электрохимический детектор селективен к веществам, которые электрохимически окисляются или восстанавливаются. Однако число определяемых этим методом соединений значительно меньше, чем это возможно с УФ детектором. Еще недавно электрохимические детекторы можно было найти только у специалистов несмотря на их потенциально очень высокую чувствительность. Это объяснялось трудностями в обращении с этими детекторами. Главными преградами на пути к их широкому использованию были недостаточная чистота элюентов, а также содержание в них кислорода, с одной стороны, и быстрое загрязнение рабочего электрода, с другой стороны. Между тем, производители таких устройств настолько удачно сконструировали измерительные ячейки, что изменение или чистка, например, стеклоуглеродного электрода стала возможной и для пользователей. Такие приемы, как электрохимическая предварительная обработка элюентов непосредственно перед подачей в дозирующий кран, привели в дальнейшем к надежному применению электрохимической детекции.

Измерительная схема базируется на системе трех электродов. Каждая измерительная ячейка содержит рабочий электрод и вспомогательный электрод. В качестве электрода сравнения служит электрод второго рода, в большинстве случаев Ag/AgCl электрод. Для рабочего и вспомогательного электрода используются плоские пластинки из стеклоуглерода. Предпочтение отдается этому материалу из-за его химической устойчивости и большей области применимого потенциала в сравнении с металлами, например, золотом или платиной. Геометрия ячейки определяется конструкцией обоих электродов и соединительным каналом в толще держателя электро-

дов. Расстояние между плоскопараллельными электродами составляет, как правило, 50 мкм. Чтобы достичь по возможности меньшего шума, который часто возникает из-за адсорбции частиц на поверхностях электродов, поверхности полируют [4.23].

Минимальный объем кювет может достигать до 1 мкл и меньше, так что электрохимическая детекция может использоваться без заметной потери эффективности разделения также в микроколоночной ВЭЖХ. Преимуществом детектора является удобство в эксплуатации за счет наличия автоматического обнуления и выбора постоянных времени. Детектор может применяться вплоть до пикограммового уровня обнаружения.

Метод применим для веществ, которые можно электрохимически окислять или восстанавливать в соответствующих элюентах. Потенциостатически устанавливают определенный потенциал и измеряют ток между электродами как функцию времени, который возникает, если проба окисляется или восстанавливается. Потенциал для электрохимически детектируемых функциональных групп лежит в пределах примерно $\pm 1,2$ В.

Кислород нужно обязательно удалять из элюентов, особенно если используется метода электрохимического восстановления. Этим методом можно определять многие органические соединения азота (например, амины, аминокислоты, гетероциклические соединения азота), нитросоединения, фенолы, альдегиды и кетоны. Ко многим соединениям электрохимические детекторы более чувствительны, чем обычные УФ детекторы.

Окислительно-восстановительный потенциал и, вместе с тем, возможность определения соединения зависят от окислительно-восстановительного потенциала элюентов. Электрохимическое детектирование принципиально не ограничивает выбор элюентов. При обращеннофазовой хроматографии соотношение воды и органического растворителя также не ограничивается. Само собой разумеется, элюент должен иметь определенную собственную проводимость, для водных систем обычно достаточно 0,05 М KNO_3 . Конечно, полезно использовать растворитель с высокой чистотой и электрохимической стабильностью. Таким образом, можно поддерживать очень низкий уровень шума.

Так как редко потенциалы отличаются для каждого класса соединений, варьируя потенциал, можно настраивать детектор либо очень избирательно на определенный класс соединений, либо, если установлен очень высокий потенциал, определяются все классы соединений.

Принципиально различают два принципа электрохимического детектирования, а именно: кулонометрическое и амперометрическое детектирование. Если превращение вещества на рабочем электроде происходит количественно, то говорят о кулонометрическом детекторе. Если в превращении участвует только определенная часть электроактивного вещества, как правило, от 5 до 10%, то речь идет об амперометрическом детекторе. Хотя на рабочем электроде амперометрического детектора преобразуется меньшее количество вещества, он часто дает лучшие результаты, чем кулонометрический детектор, так как при таком методе измерения нужно обращать внимание на чистоту поверхности электродов. С одной стороны, чувствительность электрохимического детектора возрастает с увеличением поверхности электродов, но, с другой стороны, с ростом потенциала непро-

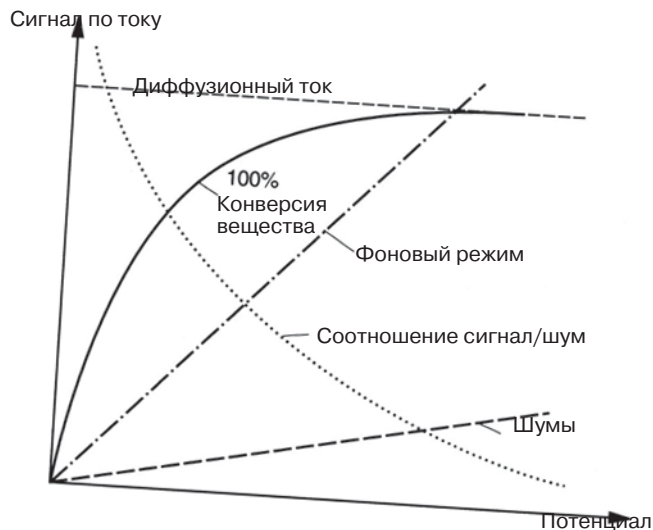


Рис. 4.29. Зависимость между конверсией вещества и интенсивностью сигнала

порционально возрастут шумы прибора. Кулонометрические детекторы нуждаются в большей поверхности электродов, чем амперометрические детекторы.

Рис. 4.29 показывает, что не существует линейной зависимости между величиной конверсии (%) и интенсивностью сигнала. Напротив, даже соотношение сигнал–шум и, таким образом, граница обнаружения снижаются и достигают величины, которая может быть в 2–3 раза ниже значений для кулонометрического детектора. Причиной такого поведения является линейная взаимосвязь конверсии и сигнала остаточного тока (англ. *offset*, фоновый режим).

Электрохимический детектор нашел особое применение в области анализа следовых количеств. Важные применения он находит и в анализе биохимических проб [4.24]. В частности, адреналин, норадреналин и допамин, а также другие биогенные амины для диагностических целей определяются вплоть до пикограммов. Кроме того, он используется в анализе наркотиков, в частности, алкалоидов, и в исследовании пищевых продуктов для определения анаболиков [4.25].

4.7.7. Детекторы светорассеяния

Есть классы соединений, которые могут лишь плохо или вовсе не регистрироваться даже очень чувствительными ультрафиолетовыми и флуоресцентными детекторами. К ним относятся биологически значимые группы сахаров и липидов. Чаще всего для этих соединений используется рефрактометрический детектор, но он обладает целым рядом недостатков. Он относительно малочувствителен и несовместим с градиентным элюированием. Кроме того, он очень восприимчив к колебаниям температуры и давления и к присутствию газов в растворителе. Альтернативой для неактивных в ультрафиолетовом свете веществ является детектор светорассеяния, который может также использоваться при градиентном элюировании. Принцип действия детектора основывается на том, что распыленный в

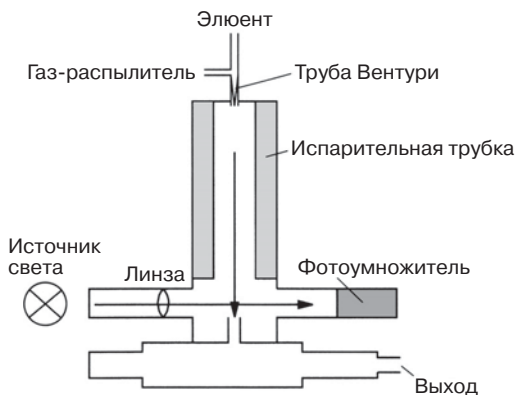


Рис. 4.30. Схема устройства детектора светорассеяния

форсунке элюент превращается в обогреваемой камере в аэрозоль, концентрация частиц которого определяется по рассеянию света [4.26].

Основные компоненты детектора светорассеяния показаны на рис. 4.30. Подвижная фаза, которая выходит из колонки, смешивается с помощью трубки Вентури с воздухом или инертным газом и распыляется в виде мелкой дисперсии. Затем эта смесь нагревается в испарительной трубке, где растворитель испаряется. Если элюат содержит неиспаряемую пробу, частицы пробы, окруженные растворителем, остаются неиспаренными. Детектирование происходит с помощью фотоумножителя, который улавливает и усиливает свет, рассеянный частицами пробы.

В качестве источника света служит вольфрамовая лампа. Механизм светорассеяния в этих условиях сложен и состоит из нескольких эффектов: Рэيلي и Ми рассеяния, преломления и отражения. Относительное участие отдельных процессов зависит от диаметра частиц и длины волны света. Если частицы малы ($r = 0,05$ мкм), то преобладает рассеяние Рэيلي. При частицах большего размера основное значение приобретает рассеяние Ми.

Если диаметры частицы сравнимы с длиной волны излучаемого света, то влияние оказывают также отражение и рефракция. Поэтому размер капли и интенсивность излучаемого света определяют по существу чувствительность детектора.

На величину капель влияют поверхностное натяжение, плотность и вязкость элюента. Как правило, их радиусы лежат в области от 0,2 до 0,3 мкм. Воспроизводимые результаты можно ожидать, только если все параметры, как, например, скорость потока, температура и т.д. остаются постоянными. В случае очень маленьких или очень больших размеров частиц чувствительность детектора сильно уменьшается. Поэтому неудивительно, что нужно проводить калибровку для различных количеств вещества в пробе.

Это единственный детектор, который позволяет работать с градиентами в ВЭЖХ для веществ, невосприимчивых к ультрафиолету. Он находит применение для детектирования термически стабильных, нелетучих соединений, например, углеводов, полимеров, липидов, глицеридов и стероидов, которые плохо поглощают в ультрафиолете и не могут быть обнаружены по изменению показателя преломления в условиях градиентного элюирования.

4.7.8. Специальные детекторы

Детекторы радиоактивности, естественно, не так широко распространены, как детекторы, рассмотренные выше. Однако они являются необходимым дополнительным инструментом при клинических и биологических исследованиях. Наряду с низкоэнергетическими облучателями с β -излучением (Н-3 и С-14) могут использоваться также облучатели с высокоэнергетическим β -излучением (Р-32) и γ -облучатель (J-125).

Поляриметрические детекторы позволяют обнаруживать оптически активные соединения в элюентах сложного состава. Они применяются, например, для определения сахара в пищевых продуктах. Чувствительность детектора от $0,002^\circ$ позволяет, в зависимости от вещества, достичь границы обнаружения на уровне микрограммов, что вполне достаточно для многих задач.

В последнее время появились комбинированные детекторы, которые объединяют определение по УФ поглощению при 254 нм, флуоресценции и проводимости. Комбинация разных принципов детектирования дает принципиально гораздо более высокую качественную надежность результата, чем каждый метод в отдельности, хотя такие приборы, конечно, не достигают характеристик моделей, точно настроенных на один метод.

4.7.9. Транспортные детекторы

Этот принцип стал известен благодаря проволочному детектору Филиппа, который уже несколько лет как снят с производства. В последнее время транспортный детектор снова появился на рынке. Схематическое изображение показано на рис. 4.31.

Проволока из нержавеющей стали, очищенная окислением в токе воздуха при высокой температуре, переносится затем в поток элюата и покрывается вследствие этого элюентом и пробой. В печи испарения элюент испаряется и уносится

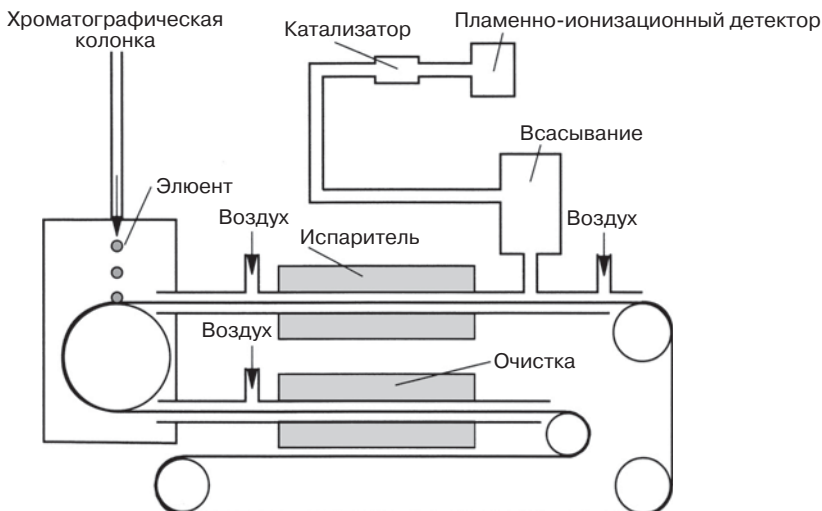


Рис. 4.31. Схематическое изображение проволочного детектора

вместе с воздухом. Оставшаяся на проволоке проба транспортируется в печь, где она окисляется и сжигается в воздушном потоке при температурах от 600 до 800 °С. Газообразные продукты сгорания отсасываются из печи для сжигания работающим на водороде устройством, подобным водоструйному насосу, и после каталитического преобразования в метан определяются в пламенно-ионизационном детекторе (ПИД). Специальная проволока длиной в 10 км и толщиной 0,1 мм, естественно, должна транспортироваться с постоянной скоростью.

Чувствительность детектора, по сравнению с чувствительностью ПИД в газовой хроматографии, не очень велика, но лежит в той же области, что и у остальных детекторов для ВЭЖХ. Если же учесть, что только незначительная часть пробы остается на проволоке, то чувствительность можно считать превосходной. Нельзя забывать, что часть пробы при испарении растворителя пропадает. При этом разница в летучести компонентов пробы может привести к ошибочным результатам количественного определения. Кроме того, не все газообразные продукты сгорания попадают в ПИД. Преимущество детектора состоит в том, что определяются исключительно свойства пробы независимо от элюентов, и, таким образом, не возникает никаких проблем при градиентном элюировании.

4.7.10. Комбинированные методы ВЭЖХ

Как и в газовой хроматографии, в ВЭЖХ также применяются комбинированные методы, чтобы получить более подробную информацию о разделенных веществах с помощью спектроскопических методов. При этом детектор с диодной линейкой для онлайн записи УФ/ВИД спектров еще не является комбинированной техникой. С одной стороны, хроматография без детектирования — это не полноценный метод анализа, с другой — никакой интерфейс для этого метода детектирования не нужен. О комбинированных методах говорят, если два разных устройства, которые во многих случаях могут независимо друг от друга решать аналитические задачи, связаны друг с другом через интерфейс. Подключение ВЭЖХ к масс-спектрометру представляет собой комбинированный метод, так как для этого требуется интерфейс [4.27].

4.7.10.1. Хромато-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС)

Масс-спектрометр все чаще используется как детектор в ВЭЖХ, особенно после того, как широкое распространение получила комбинация ГХ-МС прежде всего с квадрупольными приборами, а также с ионной ловушкой. С одной стороны, это объясняется высокой информативностью масс-спектрометров, а с другой стороны — возможностью с высокой селективностью определять нужный ион в области пг в режиме мониторинга заданного иона (англ.: SIM). При этом масс-спектрометры сегодня еще могут быть получены при скорости потока элюента примерно до 2 мл/мин. В зависимости от задачи для комбинирования МС и ВЭЖХ используются разные интерфейсы и, соответственно, разные методы ионизации [4.28].

Технически комбинация ВЭЖХ-МС несравненно сложнее, чем ГХ-МС. Это определяется, в первую очередь, высокими потоками подвижной фазы. Непросто вводить водную подвижную фазу сложного состава внутрь источника ионизации



под высоким вакуумом без потери хроматографического разрешения и без влияния на качество спектров. Поток элюента 1 мл/мин после испарения (в зависимости от растворителя) соответствует поток газа от 150 до 1200 мл/мин. В то же время вакуумная система масс-спектрометра допускает максимальную скорость потока газа только около 20 мл/мин. Поэтому прямое комбинирование ВЭЖХ-МС возможно только тогда, когда перед внесением пробы в масс-спектрометр растворитель удаляют или работают при низких скоростях потока [4.29]. Для этого предлагается три разных системы:

- прямой ввод,
- интерфейс с термораспылением и
- транспортный метод.

МЕТОД ПРЯМОГО ВВОДА ЖИДКОЙ ПРОБЫ

При небольших скоростях потока, примерно до 100 мкл/мин, возможен прямой ввод жидкой пробы (англ.: DLI) с классической ионизацией электронным ударом. При этом растворитель на струйных сепараторах в значительной степени удаляется из пробы. В случае колонок стандартного размера большая часть элюента удаляется еще до подачи пробы в масс-спектрометр, так как поступающий объем элюента слишком велик для вакуумной системы масс-спектрометра. В источник ионизации попадает только примерно 1% подвижной фазы. Если используют колонку с внутренним диаметром 0,5 мм вместо стандартной колонки диаметром 4,6 мм, то скорость потока уменьшается до 10–20 мкл/мин, то есть до объема, который можно без делителя потока вводить непосредственно в источник ионизации масс-спектрометра. Этот результат наглядно показывает, что применение микроколонок существенно упрощает комбинирование ВЭЖХ с масс-спектрометром [4.30].

МЕТОД ТЕРМИЧЕСКОГО РАСПЫЛЕНИЯ

При больших скоростях потока может использоваться метод термического распыления (англ.: TSP), при котором вещество с элюентом подается в источник ионов и элюат используется для ионизации [4.31]. Элюат, в который добавлен, например, ацетат аммония, поступает через один из капилляров, нагретых до 200–300 °С. Перегретый элюат выходит из капилляра в виде потока пара и капелек аэрозоля, которые ускоряются быстрым расширением пара почти до скорости звука (рис. 4.32). Важно, что нелетучие молекулы пробы накапливаются преимущественно в капельках аэрозоля, примерно 50% пробы, так как только 5% пара достигают источника ионов. Если растворитель содержит соль (ацетат аммония), то образование ионов происходит даже при выключенном потоке электронов: феномен, который обозначается как «ионизация термическим распылением» [4.32]. При этом вещество M превращается в ионы $M-H^+$ или $M-NH_4^+$.

По дороге в камеру ионизации капельки аэрозоля теряют молекулы растворителя и превращаются, наконец, в свободные ионы, которые сначала существуют в основном в виде ионов соли или кластеров растворителя с ионами соли. Эти кластерные ионы обуславливают то, что анализируемая область масс МС при работе с ионизацией термораспылением ограничена снизу (в общем случае, МС начинают записывать только когда соотношение масса/заряд > 120).

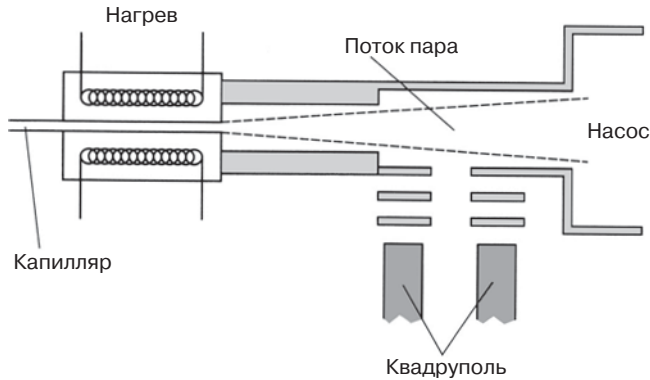


Рис. 4.32. Интерфейс термического распыления

Ионизация пробы осуществляется в газовой фазе за счет реакции молекулярных ионов и, как правило, является настолько мягкой, что не разлагаются даже термически неустойчивые сильнополярные соединения. При этом образуются как положительные, так и отрицательные ионы. Спектры термического распыления, как правило, очень просты и содержат в основном квазимолекулярные ионы, т.е. протонированные молекулярные ионы и/или молекулярные аддукты при положительной ионизации или депротонированные анионы или молекулярно-анионные аддукты при отрицательной ионизации. Эти «ион-молекулярные комплексы» статистически распределены в ЖХ элюенте и могут рассматриваться в качестве «сольватированных ионов-предшественников». Существенное отличие от других методов заключается в самом процессе ионизации, который, несмотря на еще не полностью разъясненный механизм, является очень мягким и позволяет получить высокий выход квазимолекулярных ионов для таких соединений, которые в прежних методах сильно фрагментировались или разлагались.

С интерфейсом термического распыления можно работать при скоростях потока до 2 мл/мин и не требуется деление потока. В качестве элюента, прежде всего, подходит смесь воды и метанола. Содержание воды в элюенте оказывает решающее влияние на чувствительность детектирования, которая сильно возрастает с ростом содержания воды. В качестве электролитов рассматривают исключительно летучие соли, как правило, соли аммония, такие как ацетат или формиат. Фосфатный буфер нельзя использовать, так как капилляр-испаритель сразу засорился бы. Кислые, основные или сильнополярные смеси растворителей, а также буферные растворы до 0,1 М не представляют проблем, что особенно соответствует условиям обращеннофазовой ЖХ.

ЖХ/МС с термическим распылением – это ценный метод скрининга в случае, когда оптические методы детектирования бесполезны. Это позволяет в линейном режиме сканирования получить полезную спектральную информацию, которая все же всегда, когда это возможно, должна подтверждаться ЭУ/МС (ионизация электронным ударом), так как ЭУ/МС предоставляет ту информацию, которую нельзя получить из ЖХ/МС с термическим распылением.

МЕТОД MOVING BELT

Совершенно иначе работает интерфейс на основе движущейся ленты (Moving Belt). Его основная идея – это идея транспортного детектора. При этом, например, транспортная лента, сделанная из полиимидной пленки Каптон, осуществляет отделение растворителя от аналита и делает детектирование полностью независимым от условий хроматографии и ионизации, что можно рассматривать как принципиальное преимущество этого метода по сравнению с методом термического распыления. Элюат подается на ленту в виде тонкой пленки жидкости. Нагревательный элемент в первой вакуумной камере находится под атмосферным давлением, и его задача состоит в том, чтобы испарить основную часть растворителя. Прежде чем лента входит во внутренний источник ионизации, где проба мгновенно испаряется, остатки растворителя удаляются в камере, находящейся под вакуумом.

Важно, что лента доходит до того места, где происходит ионизация электронным пучком; это позволяет реализовать ЭУ (ионизацию электронным ударом) и ХИ (химическую ионизацию). В режиме детектирования многих ионов (англ.: MID, Multiple ion detection) чувствительность метода находится в области нескольких пг, в том числе и в условиях стандартной обращеннофазовой ВЭЖХ с потоком до 2 мл/мин. Комбинация селективного обнаружения масс с УФ спектрофотометром с устойчивой к давлению ячейкой повышает надежность результатов.

Если масс-спектрометр используется как детектор, то хроматограмму можно получить, регистрируя полный ионный ток (англ.: ПИС). Показано, что интерфейс не ведет к существенному уширению пиков, но шумы на хроматограмме, как правило, выше, чем при регистрации ультрафиолетовым детектором.

В режиме мониторинга выбранных ионов (англ.: SIM) ток индивидуальных, характерных для различных компонентов ионов записывается как функция времени. Такая масс-хроматограмма $M-H^+$ ионов показана на рис. 4.33.

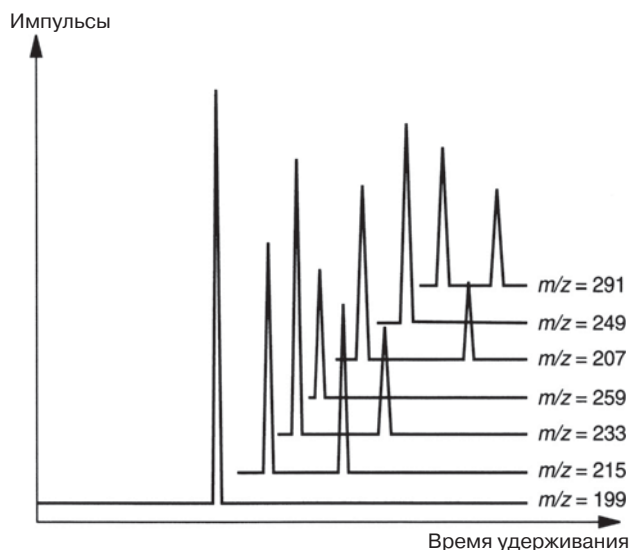


Рис. 4.33. ВЭЖХ-МС анализ в режиме мониторинга выбранных ионов

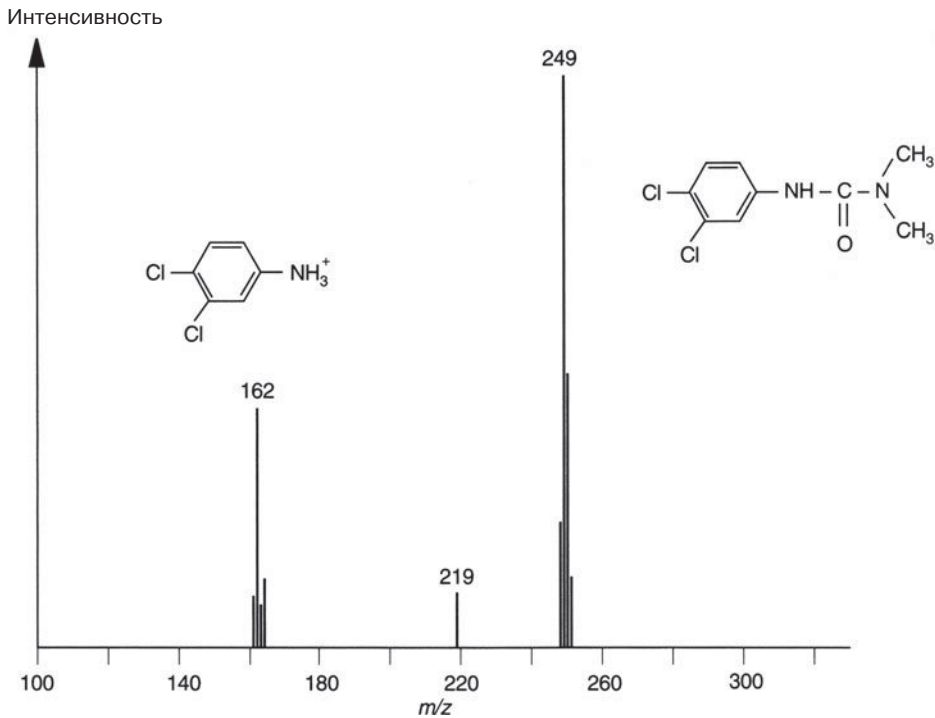


Рис. 4.34. Масс-спектр фенилмочевины

Наконец, можно получить полный масс-спектр отдельного пика, что дает самую большую информацию о неизвестном веществе. Такой масс-спектр показан на рис. 4.34 на примере фенилмочевины. Чувствительность системы несколько меньше, чем чувствительность ГХ/МС, но можно получать полные спектры примерно с 10 нг пробы, нанесенной на колонку.

Возможность проводить ионизацию электронным ударом и химическую ионизацию при свободном выборе реакционного газа — это, вероятно, самое большое преимущество интерфейса Moving Belt, который стал важным инструментом в идентификации неизвестных соединений. С другой стороны, относительно высокая температура при испарении с ленты, особенно для термически неустойчивых или плохо испаряемых соединений, легко ведет к их разложению, даже если при этом используются новые приемы, такие как прямая химическая ионизация (англ.: Direct Chemical Ionization) или бомбардировка быстрыми атомами (англ.: FAB, Fast Atom Bombardment).

4.7.10.2. ВЭЖХ-ИК

Использование спектрометров ИК-Фурье для детектирования и идентификации в газовой хроматографии хорошо известно. Поэтому напрашивалась идея использовать ИК спектрометр также как детектор для ВЭЖХ. К сожалению, для широкого применения этого метода имеются принципиальные ограничения. Обычные материалы, из которых изготовлено окошко кюветы ИК спектрометра, не приме-



нимы, по меньшей мере, в обращеннофазовой ВЭЖХ. И кроме того, большинство растворителей поглощают в широком диапазоне аналитически релевантной ИК области спектра. Поэтому до сих пор заметные приложения метода известны только в гельхроматографии, где можно работать с тетрагидрофураном или четыреххлористым углеродом. Естественно, что все ИК-Фурье спектрометры используются вместе с линзой-конденсором, чтобы сфокусировать свет на маленьких ВЭЖХ кюветах.

4.7.10.3. ВЭЖХ-ЯМР

Адаптация спектрометров ядерного магнитного резонанса к онлайн детектированию и идентификации соединений в ВЭЖХ происходила нарастающими темпами в течение последних лет, хотя первые попытки делались еще в 50-е годы. ЯМР спектроскопия дает обширную информацию о стереохимии соединений. Дейтерированные растворители очень дороги, и их использование в ВЭЖХ невыгодно, вследствие чего из экономических соображений используют только D_2O . В качестве апротонного элюента в распоряжении имеется только CCl_4 , что значительно ограничивает область применения ВЭЖХ-ЯМР. При использовании недеийтерированных растворителей интенсивные сигналы растворителя затрудняют детектирование веществ, присутствующих в незначительных концентрациях. Все же, современные вычислительные системы позволяют автоматически подавить сигналы растворителя. ЯМР детектор позволяет проводить измерения как в потоке (On flow), так и с остановкой потока (Stoppedflow).

Естественно, что применению ЯМР в ВЭЖХ во многом препятствует ограниченный выбор подходящих элюентов, а, кроме того, цена такого «детектора» оправдывает его применение только в особых случаях [4.33]. Так, интересные возможности открываются для анализа полимеров, исследования метаболитов в физиологических жидкостях и анализе смесей природных соединений. Несмотря на высокие затраты на ЯМР детектор богатая структурная информация, получаемая с этим детектором, открывает большие перспективы распространения этого метода в будущем [4.34].

4.7.10.4. ВЭЖХ индукционносвязанная плазма (ИСП)

Спектрометры ИСП могут успешно применяться для детекции гетероатомных органических соединений, а также неорганических соединений, если исследователь не испытывает ограничений в финансовых средствах. При этом было показано, что в зависимости от системы даже действительно высокие нагрузки, оказываемые на плазму водными элюентами, как, например, в обращеннофазовой ВЭЖХ, лишь незначительно мешают работе плазмы.

4.7.10.5. ВЭЖХ-ГХ

ВЭЖХ может применяться как непрерывная пробоподготовка для газохроматографического анализа следовых количеств. Для использования высокой разделяющей способности капиллярной ГХ часто необходима пробоподготовка, чтобы удалить из пробы малолетучие и очень полярные компоненты, которые вряд ли можно будет элюировать из капиллярной колонки. Для предварительного отде-

ления этих мешающих примесей можно использовать ВЭЖХ. По существу, однако, здесь идет речь только о нормальнофазовой ВЭЖХ с органическими элюентами. При непосредственной комбинации этих хроматографических методов большой объем потока подвижной фазы, поступающей из колонки ВЭЖХ, необходимо уменьшить перед подачей на капиллярную колонку, обычно путем деления потока. Подвижная органическая фаза должна быть низкокипящей и удаляется через клапан для выхода пара растворителя, причем объемы органической фазы, которые могут быть обработаны таким методом, могут достигать нескольких миллилитров.

Для переноса фракции элюента из прибора для ВЭЖХ в газовый хроматограф есть два метода. При петлевом интерфейсе полное испарение органического растворителя происходит при температурах печи выше его точки кипения. Летучие компоненты пробы испаряются вместе с растворителем и не могут быть обнаружены. Этот метод подходит, таким образом, преимущественно для труднолетучих соединений. Ниже точки кипения растворителя работает техника «удерживания в ловушке» с прямым вводом пробы на колонку. При этом с помощью селективного испарения растворителя удается также обнаружение и летучих компонентов [4.35].

Обращеннофазовая ВЭЖХ с водными элюентами мало подходит для комбинирования ВЭЖХ-ГХ, так как подача больших количеств воды на ГХ колонку, как правило, недопустима. Также нужно думать о том, что обращеннофазовая техника часто применяется для разделения нелетучих соединений и солей, а эти объекты вообще не пригодны для последующего газохроматографического анализа.

4.8. Производственная ВЭЖХ

Производственная аналитика служит для наблюдения за ходом процессов и, особенно, для управления осуществлением химических процессов его реализации, а также для контроля качества продукции [4.36]. Автоматизированная газовая хроматография — т.е. производственный газовый хроматограф, который с помощью обводного крана для непосредственного ввода пробы из производственного потока в систему газа-носителя в полностью автоматическом режиме проводит серийные анализы — уже давно является стандартным прибором производственной аналитики.

В последнее время появились также производственные ВЭЖХ приборы для полностью автоматического круглосуточного анализа (нем.: «Rundum-die-Uhr-Analyse») с автоматической подачей пробы и без задействования сотрудников лаборатории. Схема конструкции такого прибора представлена на рис. 4.35. Самые важные требования к применению производственной ВЭЖХ можно обобщить, как указано ниже:

Производственная ВЭЖХ, технически более трудоемкая по сравнению с производственной ГХ, должна быть удобна в обслуживании и выполнена во взрывозащитном исполнении. Также во взрывобезопасных помещениях требуется так называемая внутренняя защита: антикоррозионная защита всей управляющей электроники от агрессивных сред. Для высококоррозионных жидкостей предла-

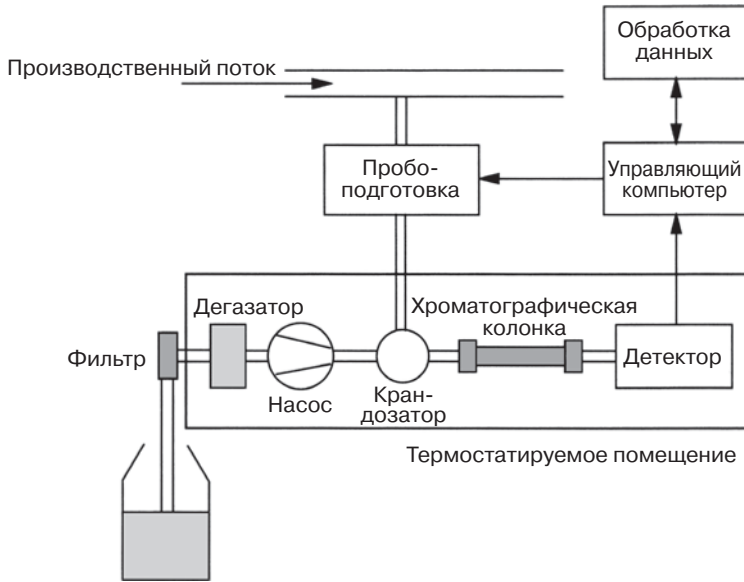


Рис. 4.35. Устройство производственного ВЭЖХ прибора

гаются насосы, инжекторы, а также УФ детекторы, у которых части, контактирующие с жидкостью, выполнены из титана.

Следующие требования — это надежность всех аналитических модулей и оптимизация для долговременной работы как колонок, так и методов детектирования. Все приборы и программное обеспечение должны быть пригодны для процесса. Управляющая электроника необходима для задач по переключению и контролю в системе анализа. Полностью автоматизированные компьютеризованные программы диагностики должны гарантировать круглосуточную бесперебойную работу. К диагностическому программному обеспечению принадлежат предупреждения, защитные отключения при негерметичности и при отказе предохранителя от превышения давления, а также диагностика насоса, клапанов и детектора.

Система обработки данных должна уметь распознавать ухудшение эффективности разделения и предпринимать такие контрмеры, как, например, промывка разделительных колонок. Наряду с этим требуются специальные помещения для больших емкостей с элюентами, которые снабжены приспособлением для автоматической дегазации и устранения пузырей, а также защитным вентиляционным устройством для удаления возможных ядовитых паров.

Так как никогда нельзя исключить наличие веществ, которые поздно элюируются и мешают проведению последовательных анализов, то надежное завершение анализов возможно только посредством обратной промывки колонок. В tandemном варианте работают с двумя аналитическими колонками и двумя системами насосов, причем каждая из колонок после завершения анализа промывается в обратном направлении. Этим достигают повышения селективности и становится возможным анализ проб в трудных матрицах без применения обычной в лабораторном анализе пробоподготовки, т.е. только за счет использования переключе-

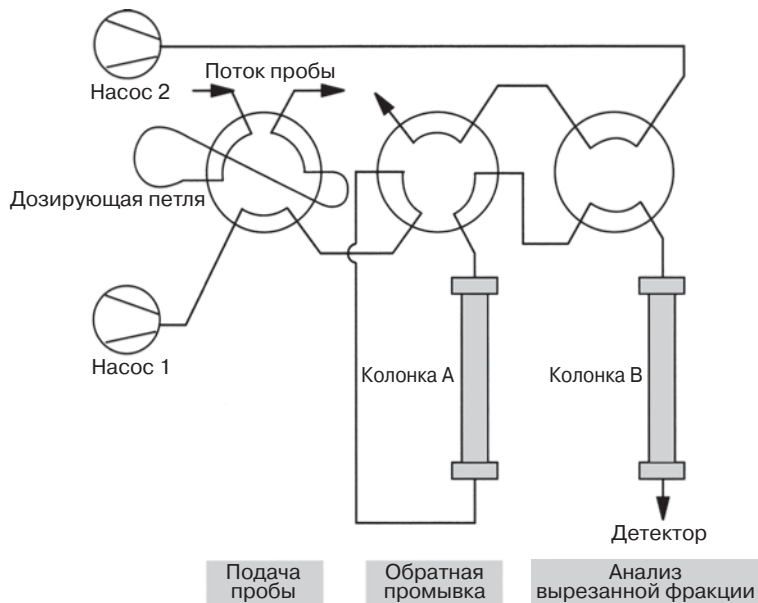


Рис. 4.36. Схема колонок в процессной ВЭЖХ

ния двух колонок и вырезания анализируемых фракций, как это представлено на рис. 4.36.

Возможные области применения производственной ВЭЖХ — это химическая промышленность, в частности, производство пластмасс, лаков, смягчителей, детергентов; биохимическое или фармацевтическое производство, например, производство антибиотиков, гормонов, витаминов и сахаров; анализ воды на пестициды, анионы и тяжелые металлы; производство полупроводников (анализ вызывающих коррозию анионов); анализ на электростанциях качества пара и конденсата, ингибиторов коррозии, полноты удаления серы и азота из дыма на стадии промывки; а также гальваническая, бумажная и пищевая промышленность. Перечисление областей применения показывает, что в промышленной ВЭЖХ важная роль принадлежит ионной хроматографии. Можно ожидать, что ввиду увеличения количества задач по контролю и управлению процессами, происходящими в окружающей нас среде, ВЭЖХ наряду с ГХ займет свое место в промышленном анализе.

4.9. Миниатюризация ВЭЖХ

Сегодня стремление к миниатюризации наблюдается повсюду, где по условиям поставленной аналитической задачи в распоряжении имеются слишком малые количества проб, которые нельзя разделить с помощью обычной ВЭЖХ, или там, где важное значение приобретают экономия подвижной фазы и сокращение подлежащих утилизации отходов [4.37]. Эта технология «уменьшенного размера» сегодня больше не является исключительно элитной техникой, а находит широкое

Таблица 4.5. Различные колонки для ВЭЖХ

Тип	Диаметр, мкм	Длина, см	Размер частиц, мкм	Скорость потока, мкл/мин	Объем пробы, мкл
Стандартные	2000–5000	10–25	3–10	500–2000	10–5
Микро	500–2000	10–25	3–10	10–100	< 1
Наполненные капиллярные	30–500	10–200	1–10	0,1–20	0,05–1
Полые капиллярные	5–50	200–3500	–	0,1–1	0,05–0,5

применение в исследованиях и рутинной работе, что связано, с одной стороны, с коммерческой доступностью высокоэффективных хроматографических колонок, а с другой – с заметным прогрессом в приборостроении [4.38].

В зависимости от внутреннего диаметра используемых хроматографических колонок ВЭЖХ подразделяют на несколько областей, которые представлены в табл. 4.5.

Под ЖХ с колонками большого диаметра подразумевают сегодня «стандартную» ЖХ с внутренним диаметром колонок от 2 до 5 мм. Наполненные микроколонки и капиллярные колонки сегодня доступны коммерчески, тогда как полые капиллярные колонки, которые издавна успешно использовали в ГХ, находятся в стадии разработки.

Для миниатюризации ВЭЖХ нужны приборы с предельно малыми мертвыми объемами и минимальным внеколоночным размыванием пиков. Все компоненты системы должны иметь микроразмеры. Насос должен прокачивать микропотоки точно и без пульсаций. Особое внимание нужно обращать при этом на градиентное элюирование, так как при столь малых мертвых объемах, необходимых для микроколонок, объемы обычного смесителя и насоса слишком велики. Система ввода пробы должна быть предназначена специально для ввода минимального объема пробы, причем автоматизация способствует экономии времени и финансовых затрат. Решающая роль для эффективности и чувствительности определения играют тип и качество детектора.

4.9.1. Микроколоночная техника

Микроколоночная техника для ВЭЖХ уже давно находится в поле зрения производителей и пользователей. В последние годы благодаря интенсивным исследованиям она достигла больших успехов и начинает использоваться как рутинный метод в лабораториях. Микроколоночная хроматография не является новым достижением в области ЖХ, и еще в 1969 году было описано применение колонок диаметром 1 мм, которые оозначались как «колонки малого диаметра» [4.39]. Сегодня колонки с диаметром 1 мм и меньше обычно обозначают как микроколонки, и соответственно этому введено название «микроколоночная хроматография» [4.40].

То, что повышенный интерес к этой новой технике стали проявлять только в последнее время, объясняется многими факторами. С одной стороны, нужно было преодолеть в трудности приборостроении, и, с другой стороны, техника получения колонок также была развита недостаточно, чтобы способствовать прорыву

этого нового метода. Вначале микроколонокки заполнялись 10- и 20-микронными частицами, длина колонки составляла до 100 см, а внутренний диаметр выбирался между 1,0 и 1,5 мм. С этими трудностями удалось справиться в течение последних лет. Что касается техники получения колонок, то наряду с колонками диаметром 4,6 мм наиболее распространенные стационарные фазы стали также коммерчески доступны в виде колонок диаметром 1 и 2 мм. Сегодня микроколонокки можно заполнять так же хорошо и воспроизводимо, как и стандартные колонки. С определенного времени и инструментальная база для микро ВЭЖХ перестала быть проблемой.

Насосы позволяют пользователю работать с постоянным потоком в области от 10 до 100 мкл/мин, чтобы использовать микроколонокки в оптимальном режиме. Такие низкие скорости потока ведут к определенным особенностям и с любой точки зрения требуют специального исполнения хроматографической системы. Если хотят полностью использовать преимущества микроколоночного метода, то, конечно, надо пересмотреть все параметры (поток, форму градиента, длину колонок). Прежде всего, при переходе к колонкам с внутренним диаметром 1 мм необходимо изменить соответствующим образом приборное оснащение, например, использовать детекторы с микроячееками. В то время как стандартные детекторы обладают объемом ячейки от 3 до 12 мкл, микроколоночные детекторы требуют объем ячейки от 0,8 до 3 мкл. Кроме того, больше нельзя использовать градиент низкого давления, и из-за малых скоростей потоков смещение должно происходить на стороне высокого давления.

4.9.1.1. Преимущества микроколоночной хроматографии

Первым и общим преимуществом применения микроколоночной техники является возможность экономии зачастую дорогих растворителей, которое вытекает из соотношения квадратов диаметров колонок. При переходе от скоростей потока 0,5–2 мл/мин, используемых в стандартной ВЭЖХ, к скоростям потока 10–50 мкл/мин, используемых в микроВЭЖХ, достигается 10–200-кратная экономия растворителя. Это важно, прежде всего, там, где нужно работать с дорогими растворителями или проводить очень много анализов. Кроме того, утилизация меньших количеств растворителей всегда благоприятна с точки зрения защиты окружающей среды.

Объемы проб для микроколонокки в 10–50 раз меньше, чем для стандартных колонок. Это, например, представляет интерес при анализе биоматериала, где в распоряжении часто имеется ограниченное количество пробы. Преимуществом является также возможность достигать очень большого числа теоретических тарелок и, благодаря этому, разделять очень сложные смеси. Отличительная черта микроколонок — это возможность объединять их в серии, то есть подключать друг к другу. Число теоретических тарелок такой серии складывается из числа тарелок для каждой отдельной колонки [4.41].

Зависимость ширины пика от скорости потока может быть, как известно, выражена уравнением Ван-Деемтера, которое ранее было получено в ГХ, но справедливо также и для ЖХ. Из него следует, что малая высота тарелки достигается при использовании частиц, имеющих малый диаметр. Уменьшение размеров час-

тиц, все же, имеет практические границы, так перепад давления на колонке растет с уменьшением диаметра частиц и могут проявляться негативные эффекты, как, например, температурные эффекты или нестабильность материала сорбента. Поскольку в микроВЭЖХ используются более низкие скорости потока, то это позволяет использовать более мелкие частицы при сохранении приемлемого давления, причем возможно рутинное применение колонок с частицами от 1 до 2 мкм.

Следующим преимуществом микроВЭЖХ является более высокая чувствительность, обеспечиваемая микроколонками по сравнению со стандартными колонками диаметром 4,6 мм. Улучшенные пределы обнаружения вытекают из уменьшения объема элюируемых пиков. Теоретически объемы пиков уменьшаются пропорционально первой степени длины колонки и квадрату ее диаметра. Таким образом, сравнивая две колонки с одинаковой стационарной фазой и одинаковой длины при переходе от колонок с диаметром 4,6 мм к колонкам диаметром 1 мм, объем уменьшится в $(4,6 : 1)^2 = 21,16$ раза. Так что при одинаковых количествах пробы ее концентрация в пике должна вырасти с учетом этого фактора в 21,16 раза. На практике, тем не менее, наблюдаются несколько меньшие величины, так как, прежде всего, в микроВЭЖХ очень сильно проявляются эффекты, которые приводят к внеколоночному уширению пиков. Очень важно, поэтому, все соединения между инжектором и колонкой, а также между колонкой и детектором делать предельно короткими.

Чтобы полностью использовать преимущества микроколонок, необходимо тщательно обдумывать процесс хроматографии. С чисто хроматографической точки зрения, большое преимущество микроколонок состоит в возможности того, что можно легко переходить от высокого разрешения к высокой скорости потока и наоборот. Высокая скорость потока означает, как правило, короткое время анализа и далеко неидеальное разрешение. Низкие скорости потока приводят к длительным временам анализа и высокой разрешающей способности системы. Как правило, нельзя добиться одновременно высокой скорости и высокого разрешения [4.42].

Использование длинных микроколонок в жидкостной хроматографии, которое в большинстве случаев удлиняет время анализа (описаны примеры от 3 до 20 часов!), может быть оправдано только в работе со сложными смесями, а также в системах, где требуется очень высокая эффективность разделения и, как следствие этого, приходится мириться с длительным временем анализа. С другой стороны, было показано, что может быть разработан микроколоночный метод, рассчитанный на предельно короткое время анализа в сочетании с высокой чувствительностью. Описаны примеры разделения, которые длятся всего 20–30 секунд.

4.9.2. Капиллярная ЖХ

Капиллярная ЖХ является вместе с микроколоночной хроматографией дальнейшим развитием ВЭЖХ в направлении миниатюризации. Капиллярные колонки для ЖХ делают из кварцевых капилляров и имеют внутренний диаметр 320 мкм при длине 25 см. Их наполняют силикагелем для нормальной или обращенно-фазовой хроматографии, имеющим сферическую или неправильную форму. Пре-

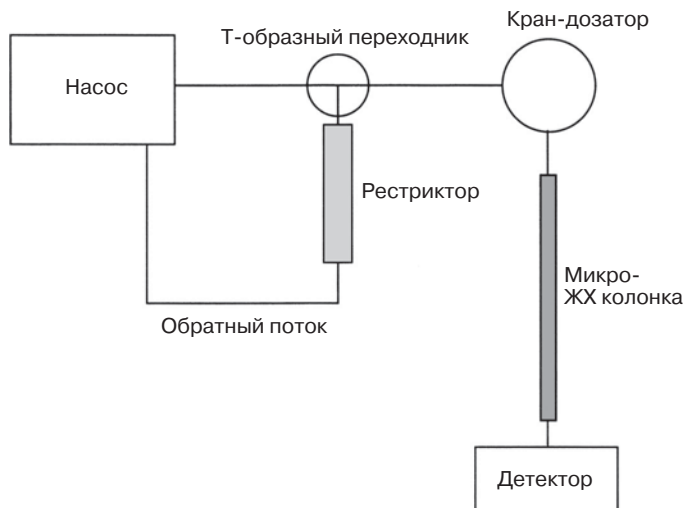


Рис. 4.37. Устройство капиллярной ЖХ системы

имущество капиллярной ЖХ вытекает из предельно малого внутреннего диаметра колонки и, соответственно, минимальной дисперсии пика. Полная капиллярная ЖХ система состоит из насоса, инжектора, колонки и соответствующего детектора.

Поток в капиллярной ЖХ обычно лежит между 3 и 10 мкл/мин. Для таких потоков лучше всего подходят микрошприцевые насосы, обеспечивающие маленькие скорости потоков, хотя могут применяться и обычные ЖХ насосы, если их снабжают делителем потока. Рис. 4.37 показывает деление потока растворителей с помощью Т-образного переходника, не имеющего мертвого объема, и рестриктора.

Проба подается на колонку с помощью обычного крана-дозатора, снабженного петлей объемом от 60 до 1000 нл. Применения, которые были разработаны для обычных ЖХ колонок, можно также без труда перенести на микроЖХ колонки, так как в обоих случаях природа стационарной и подвижной фаз одна и та же.

4.9.2.1. Преимущества капиллярной ЖХ

Из-за стабильной, но все же менее плотной упаковки капиллярные колонки показывают в 1,5–2 раза более высокую проницаемость, чем обычные колонки. Поэтому колонки приемлемой длины могут наполняться частицами с меньшим размером зерна от 1 до 2 мкм без превышения предельных давлений, допустимых для используемых приборов. С другой стороны, колонки с высоким разрешением могут быть получены заполнением колонок длиной в несколько метров сорбентами с большим диаметром частиц (от 5 до 10 мкм).

Чувствительность концентрационнoзависимых детекторов, таких как УФ, флуоресцентные, рефрактометрические и электрохимические детекторы, пропорциональна концентрации в максимуме пика. Эта концентрация растет с уменьшением диаметра колонок. Поэтому уменьшение стандартного внутреннего диа-

метра с 4,6 мм до 0,32 мм приводит к повышению чувствительности примерно в 206 раз. Очевидно, что на большую колонку можно наносить значительно большее количество пробы, так что если в распоряжении имеется достаточно большое количество пробы, то увеличение чувствительности практически отсутствует. Тем не менее, во многих приложениях в распоряжении имеются только крайне незначительные количества пробы, так что капиллярная ЖХ предоставляет разумное решение проблемы.

Минимизация инструментального вклада в уширение пиков происходит за счет оптимизации всех мертвых объемов системы, включая их геометрию, которые приводят к уширению пиков. К ним принадлежат система ввода, соединительные капилляры и переходники, а также, прежде всего, объем ячейки детектора. Чтобы поддерживать эффективность разделения и разрешение капиллярной колонки, требуются детекторы с крайне маленькими объемами ячейки. К тому же, в УФ детекторах согласно закону Ламберта—Бера длина оптического пути детекторной ячейки должна быть достаточно большой, чтобы можно было достичь удовлетворительной чувствительности определения. Проточные кюветы для УФ детекторов состоят из кварцевых капилляров с внутренними диаметрами от 50 до 320 мкм. В определенной части кварцевый капилляр освобожден от полиимидного покрытия и в этом месте просвечивается УФ лучом. Такие кюветы с вертикальным расположением к оптической оси подходят для измерения крайне незначительных объемов элюента (от 1 до 100 мкл) и вызывают минимальную дисперсию пика. С другой стороны, незначительная длина этих капиллярных ячеек, в соответствии с законом Ламберта—Бера, вызывает очень сильное чувствительности прибора.

Существенно лучшую возможность предлагает ячейка, показанная на рис. 4.38. Ячейка состоит из кварцевого капилляра с внутренним диаметром 75 мкм, который укреплен в форме Z в держателе. Держатель ориентирует капиллярную ячейку

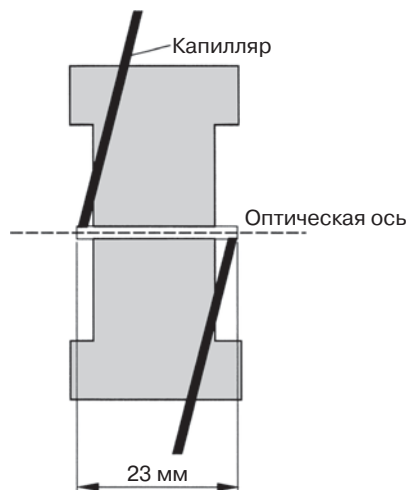


Рис. 4.38. Конструкция капиллярной ячейки для УФ детектора с ориентацией вдоль оптической оси

ку вдоль оптической оси детектора. Длина оптического пути составляет 2 см, вследствие чего чувствительность обнаружения выше в 100–500 раз, чем при вертикальных ячейках. Несмотря на большую длину пути общий объем ячейки составляет только 90 нл.

Низкие скорости потоков позволяют непосредственно комбинировать капиллярную ЖХ с масс-спектрометрией. Нет необходимости использовать делитель потока, что, конечно, повышает чувствительность метода. Определенно, этот вид комбинации ЖХ-МС открывает фантастические возможности.

Благодаря меньшему диаметру капиллярных ВЭЖХ колонок по сравнению с обычными колонками расход растворителей уменьшается. Обычные объемные скорости насосов в капиллярной ЖХ составляют от 3 до 6 мкл/мин. Насос работает по так называемому принципу шприца. Объем цилиндра насосов составляет около 50 мл, т.е. одного наполнения насоса достаточно, чтобы в течение примерно четырех недель проводить точные анализы, при этом подача растворителя свободна от пульсаций.

Малые объемы колонок обуславливают малые объемы элюирования. Пики выходят – при правильном устройстве прибора – более узкими и высокими. Это означает заметное улучшение пределов обнаружения. Поэтому капиллярная ЖХ отвечает запросам тех, кто должен обходиться самыми небольшими количествами пробы. Это касается, прежде всего, аналитиков, работающих в областях биохимии и биотехнологии, токсикологии и судебной химии, а также медицины.

При типичном объеме проб от 60 до 90 нл разделения на капиллярных колонках происходят предельно быстро (в частности, за секунды) и при том с высокой чувствительностью.

4.9.2.2. Системные ошибки микрометода

Решающим для элюирования какой-либо части пробы с колонки является – при прочих постоянных условиях – не время удерживания, а объем удерживания, во всяком случае, до тех пор, пока в колонке сохраняется ламинарный поток, или, точнее, до тех пор, пока скорость потока находится в области кривой Ван-Деемтера, в которой можно ожидать качественно хороших результатов разделения. Если, однако, специфический для вещества объем удержания является достаточным для идентификации неизвестных фракций пробы при прочих постоянных условиях (однако, переменных скоростях потока!), тогда требование постоянства потока в детекторе для получения воспроизводимых времен удержания представляет собой особый случай, когда от этого требования с целью возможного упрощения прибора можно отказаться.

С уменьшением диаметра колонки становится все труднее добиться постоянства потока в детекторе. С технической точки зрения, более высокое механическое сопротивление потоку в узких колонках между насосом и детектором действует как непостоянное демпфирующее устройство. Обыкновенные хроматографические насосы (система с коротким ходом поршня) оказываются неспособными создать поток с малой объемной скоростью, что обусловлено неравномерностью подачи элюента в нижней области скоростей потока. Кроме того, результатом пульсаций у этих возвратно-поступательных насосов является более высокий шум при



использовании чувствительных к пульсациям детекторов, как, например, рефрактометрического детектора [4.43].

Пульсации возникают также и у насосов с длинным ходом поршня, т.е. шприцевых насосов, в частности при работе с градиентным элюированием. Разный состав элюентов с изменяющейся во время анализа сжимаемостью при неизбежных колебаниях давления и разным уровне наполненности шприцевых насосов приводит, в особенности при незначительных скоростях потока микрометода, к трудно контролируемым и плохо воспроизводимым градиентам. Причина выпадения максимумов пиков из отведенных для них временных окон, в любом случае, связана с непостоянством скоростей потоков.

Новый принцип обработки данных позволяет обойти эти трудности. Отклонения от заданных величин потоков подвижной фазы измеряются детекторной системой и учитываются при последующей обработке данных. Вследствие этого отображение и расчет хроматограммы происходят таким образом, как будто бы во время всего анализа в детекторе наблюдался абсолютно постоянный поток, даже если на самом деле его и не было.

Искаженные вследствие колебания скоростей потока аналоговые сигналы детектора передаются аналого-цифровому преобразователю (АЦП). Измеритель скоростей потока управляет скоростью сбора данных на этом АЦП. Эта схема представлена на рис. 4.39. Фактор коррекции K колеблется около единицы и определяется соотношением:

$$K = \text{измеренная скорость потока} : \text{заданная скорость потока.}$$

Микропроцессор записывает оцифрованные сигналы на промежуточный накопитель, затем вызывает их с задержкой по времени и уже на постоянной скорости передачи пересылает их второму АЦП. Таким образом, возникает исправленный аналоговый детекторный сигнал, который передается интегратору или само-

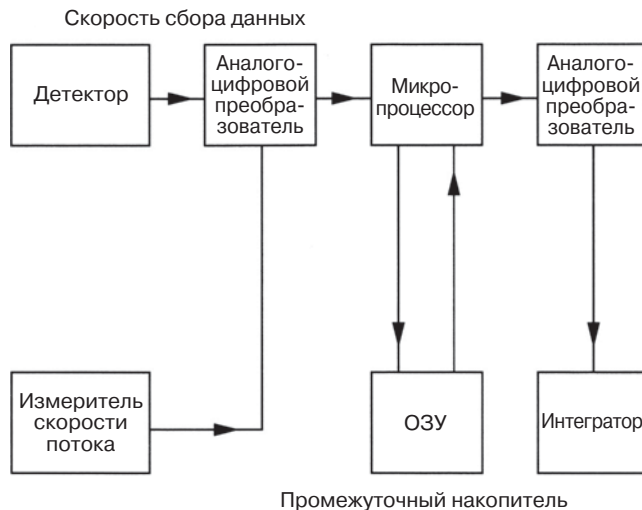


Рис. 4.39. Блок-схема компенсационной схемы

писцу. Совершенно свободную от пульсаций подачу элюента осуществляют насосы с длинным ходом поршней, которые выполнены в форме тандемного насоса (т.е. насоса с двойным поршнем), чтобы обеспечить неограниченную подачу растворителя. Движущийся вперед поршень шприцевого насоса постоянно вращается, вследствие чего между поршнем и уплотнением поршня постоянно сохраняется трение скольжения и не возникает время от времени трение сцепления. Система дополнительно компенсирует даже самые небольшие механические ошибки трансмиссии и шпинделя непосредственным измерением тяги шпинделя в аксиальном направлении с предельно высоким разрешением 0,5 мкм. Быстрое обратное регулирование путем сравнения величин «задано/получено» после каждых 0,025 мкл прокаченного объема гарантирует синхронность заданного и фактического градиента и свободный выбор программы градиента.

Если во время анализа возникают колебания давления, то могут появляться постепенные отклонения градиента, которые связаны с разной сжимаемостью компонентов элюента и изменяющимся соотношением компонентов в смеси во время анализа. Поэтому при градиентном элюировании работают с точно регулируемым постоянным давлением, пренебрегая при этом наблюдаемыми колебаниями скорости потока.

4.10. Препаративная ВЭЖХ

Препаративная ВЭЖХ из-за своих размеров представляет другую крайность в сравнении с микроВЭЖХ и обозначается так же, как препаративная жидкостная хроматография под давлением. Эффективность ВЭЖХ при выделении одного или нескольких компонентов из сложной смеси объясняет растущее значение препаративного метода как метода очистки. Препаративная ВЭЖХ отличается от ее аналитического аналога, прежде всего, по своим задачам.

Цель препаративной хроматографии – это сбор фракций выделенных чистых продуктов или получение предочищенных промежуточных продуктов. Препаративная ВЭЖХ вступает в действие, если классические методы разделения, перегонка, кристаллизация и т.д. не ведут к желаемому успеху. Очистка продуктов часто применяется в биологии и биохимии, тогда как выделение продукта проводится преимущественно в препаративной химии. Для этого имеется автоматически работающая препаративная система ВЭЖХ с подходящими коллекторами фракций, которые управляются по сигналу детектора и собирают нужные чистые фракции в специальные контейнеры [4.44].

Все чаще ставится проблема выделения высокоочищенных реагентов из смесей продуктов синтеза или экстрактов природных материалов. Тем не менее, прежде чем приступить к выделению, следует сначала аналитически идентифицировать интересующее вещество в исходной пробе сложного состава. Затем, после успешного аналитического разделения, должно проводиться разделение на граммовом или даже килограммовом уровне, что часто приводит к новым проблемам. Отработанные при аналитическом разделении хроматографические условия должны быть адаптированы к обычным для препаративных разделений большим диаметрам колонок и высоким скоростям потоков [4.45].



При препаративном разделении в первую очередь необходима высокая нагру- зочная емкость колонки, т.е. возможность разделения возможно большего количе- ства пробы за один цикл. Так как с помощью автоматических коллекторов фракций процесс можно проводить и ночью, то временные затраты на разделение имеют второстепенное значение. Высокие скорости потоков с соответственно большими количествами пробы можно часто достичь только тогда, когда используются ста- ционарные фазы с большим диаметром частиц. Так как при этом требуется не такое высокое давление, как при аналитическом разделении, то в большинстве случаев используются компоненты приборов для жидкостной хроматографии низкого дав- ления (ЖХНД) [4.46]. Эти колонки, однако, обладают меньшим числом тарелок и более низким разрешением. На практике разделения часто приходится проводить в неоптимальных условиях, например, из-за низкой растворимости пробы или не- совместимости растворителей, оптимальных для хроматографии, с последующими этапами работы с выделенным продуктом.

Разработка препаративного метода разделения в значительной степени свя- зана с экономической эффективностью. Из-за размеров колонки все большее зна- чение приобретают расходы на растворитель и сорбент. Целью препаративного разделения является выделение желаемого продукта с определенной степенью чистоты в максимальном количестве и за минимальное время. Для достижения максимальной производительности препаративные колонки часто перегружают. В этом случае, учитывая количество и объем вещества, колонка больше не рабо- тает в оптимальном режиме, и разрешение снижается. При этом в большинстве случаев, чисто эмпирически, увеличивают объем вводимой пробы до тех пор, пока разделенные пики не начинают сливаться.

Если хотят повысить нагрузку, сохранив эффективность разделения, то будет разумно увеличить размер зерна носителя и длину колонки, причем длина колон- ки должна увеличиваться пропорционально квадрату отношения диаметров час- тиц. При этом, как благоприятный побочный эффект, также квадратично отно- шению диаметров частиц увеличивается и проницаемость колонки, и, соответ- ственно, квадратично снижается давление на колонке.

Так как успешное разделение может быть уничтожено неправильным управ- лением системой, то следует уделить внимание надежной работе коллектора фрак- ций, особенно если он работает круглосуточно. Все нарушения должны детекти- роваться системой, и отдельные фракции, соответственно, должны удаляться из системы. Чтобы хроматографическое разделение можно было проводить в авто- матическом режиме, его нужно оптимизировать таким образом, что хроматограм- мы при повторных вводах пробы будут мало отличаться друг от друга [4.47].

При переходе от успешного аналитического разделения к препаративным мас- штабам необходимо, чтобы стационарная фаза, используемая в препаративном раз- делении, отличалась как можно меньше от той фазы, которая использовалась в ана- литическом разделении. Подвижная фаза должна как можно проще отделяться от сорбатов, для чего, как правило, используется роторный испаритель. В качестве материала колонок подходят устойчивые к давлению стеклянные колонки, кото- рые могут выдерживать давление до 100 атм и пользователь может наполнять их всеми коммерчески доступными стационарными фазами [4.48].

4.11. Выводы

Под ВЭЖХ понимают сегодня высокоэффективную жидкостную хроматографию, а не хроматографию высокого давления. Хотя понятие «колоночка» в названии отсутствует, имеется в виду только колоночная хроматография, а не тонкослойная, которая сегодня также является высокоэффективной хроматографией.

С момента создания в начале семидесятых годов ВЭЖХ была и остается предметом в высшей степени интенсивных научных исследований с известным межотраслевым характером. Научному и техническому прогрессу ВЭЖХ в равной мере способствовали аналитики, химики, физики и инженеры. ВЭЖХ стала сегодня одним из самых важных высокоэффективных методов разделения, что очевидно из ежегодных продаж приборов, колонок, растворителей и вспомогательных программ, а также из числа научных публикаций по анализам, проведенным с помощью ВЭЖХ. Этот метод применяется сегодня почти во всех областях производства, контроля качества продуктов и экологии. Основное направление дальнейшего развития — это фармацевтическое производство и анализ лекарственных средств, экологический анализ, клиническая химия, биохимия и биотехнология, а также анализ пищевых продуктов.

Для известных методов разделения, таких как ВЭЖХ, не стоит ожидать сенсационных инноваций, в то же время в самых различных областях применения постоянно происходят улучшения, причем основное внимание уделяется автоматизации метода и непосредственному соединению пробоподготовки и метода определения. Высокие требования предъявляются к рутинным автоматическим устройствам для контроля в области экологического анализа, что связано с высокой сложностью процесса жидкостной хроматографии и его зависимостью от примесей в пробе и элюентах, часто присутствующих в низких концентрациях. В последнее время впервые были внедрены непрерывно работающие, надежные измерительные станции для автоматического контроля речной воды. Остатки пестицидов в реках могут, таким образом, контролироваться непрерывно.

4.11.1. Сравнение ГХ-ВЭЖХ

Для того чтобы разделить вещества друг от друга, их необходимо перемещать по колонке. Подвижная фаза может быть газообразной, жидкой или сверхкритической, тогда как стационарная фаза может быть либо жидкая, либо твердая. Агрегатное состояние подвижной фазы определяет области применения метода. ГХ и ВЭЖХ с их преимуществами и недостатками сосуществуют рядом друг с другом. Как говорил Парацельс,

Рядом, но не друг против друга.

Целью является правильный результат.

Так как газы смешиваются друг с другом в любых соотношениях, то газовая хроматография — более универсальный метод, чем ВЭЖХ. Летучесть веществ, в первом приближении, создает меньше проблем при вводе пробы в ГХ, чем растворимость веществ при вводе пробы в ВЭЖХ. Вместе с тем, это преимущество



ГХ является и ее недостатком, так как все анализируемые вещества должны переводиться в парообразное состояние.

Так как жидкости не всегда смешиваются друг с другом в любых соотношениях, а твердые вещества растворимы не во всех растворителях, то метод ВЭЖХ сильно ограничен уже при вводе пробы. Основное преимущество ВЭЖХ состоит в том, что исследуемые вещества не должны переводиться в пар, так как наибольшие ошибки в ГХ появляются как раз во время испарения.

В основном можно сказать следующее:

- ВЭЖХ подходит для всех растворимых веществ;
- ГХ подходит в тех случаях, когда можно испарить или провести пиролиз самих веществ или их производных.

Исключениями являются только

- термолабильные вещества,
- вещества, которые реагируют во время испарения друг с другом,
- вещества, которые образуют ионы.

В то время как в ГХ необходимые для разделения взаимодействия происходят исключительно между молекулами аналита и стационарной фазой, а подвижная фаза служит только для транспорта, в ВЭЖХ взаимодействия происходят также между молекулами аналита, стационарной фазой и элюентом. Элюент взаимодействует также со стационарной фазой. Таким образом, в обращеннофазовом методе полярная подвижная фаза полностью экранирует стационарную фазу от полярных взаимодействий с молекулами аналита.

Изменением подвижной фазы от полярной к неполярной молекулы аналита, связанные на стационарной фазе за счет дисперсных взаимодействий, снова освобождаются — элюируются. Этот метод нельзя использовать в ГХ. В то время как для анализа в ГХ ионные соединения должны быть модифицированы, в ВЭЖХ удается непосредственный анализ с помощью ионпарной хроматографии на обращенных фазах. Классический пример ВЭЖХ анализа ионов — это ионная хроматография на колонках с ионообменными сорбентами как современный уровень развития техники в области анализа анионов и катионов. Для ГХ здесь нет места.

В ВЭЖХ сегодня работают преимущественно с обращеннофазовым методом. В ГХ, которая подразумевает почти исключительно работу с капиллярными колонками, используют в большинстве случаев так называемые химически привитые сорбенты. При этом для десорбции адсорбированных молекул аналита в распорядке имеется лишь варьирование температуры и давления. Таким образом, если в ГХ для элюирования должны изменяться чисто физические параметры, то в ВЭЖХ используются целенаправленные химические воздействия. Программирование температуры не дает в ВЭЖХ нужных для разделения эффектов. В то время как в ГХ десорбция происходит просто и быстро с повышением температуры, в ВЭЖХ повышение температуры может приводить к необратимой адсорбции и, тем самым, к разрушению поверхности сорбента.

Основную проблему как в ГХ, так и в ВЭЖХ представляют поверхностные силанольные группы. В то время как в ГХ в газовом анализе еще применяют си-

ликагель, оксид алюминия или молекулярные сита со свободными ОН группами, чистый силикагель и оксид алюминия почти полностью исчезли из ВЭЖХ.

Сегодня колонки и для ГХ, и для ВЭЖХ используют подложки с низким содержанием ОН групп. Фазы на основе силикагеля и колонки из плавленного кварца производятся по возможности свободными от катионов и освобождаются от остаточных ОН групп путем силанизации. В то время как в ГХ остаточные силанольные группы приводят лишь к усиленному «хвостованию», в ВЭЖХ они могут полностью блокировать необходимые взаимодействия. В этом случае остатки силанольных групп удаляются методом так называемого эндкеппинга (Endcapping). Из-за необходимой стабильности к гидролизу для ВЭЖХ нужны фазы с Si–N или Si–C связями. Si–O–C связи не подходят здесь из-за их чувствительности к гидролизу.

В противоположность ВЭЖХ в ГХ дезактивацию производят в газовой фазе при высокой температуре. Для этого используют почти исключительно октаметилтетрацикросилоксан и гесаметилерицикросилоксан, а также их производные. Последующее силанирование больше не требуется, так как в ходе этих реакций в капиллярных колонках происходит не только силанирование поверхности, но и образование полимерных слоев за счет раскрытия цикла и последующей полимеризации.

Величина поверхности используемых в ВЭЖХ сорбентов лежит между 100 и 500 м²/г. Обычные материалы для ГХ характеризуются поверхностями от 0,5 до 3 м²/г. Непосредственно с ГХ сегодня можно сравнивать только ВЭЖХ на капиллярных колонках, так как за исключением отдельных случаев, преимущественно при разделении газов, в ГХ никакие наполненные колонки больше не применяются.

4.11.1.1. Хроматографические колонки

Сегодня для ВЭЖХ преимущественно используются колонки с обращенной фазой (ОФ) С18 длиной от 12,5 до 25 см. В ГХ используются, почти исключительно, капиллярные колонки с полидиметилсилоксановой стационарной фазой длиной 30 или 60 м. Переменной является только толщина слоя стационарной фазы, которую изменяют, чтобы обеспечить, особенно в случае МС и ИК-Фурье детекторов, более высокую нагрузочную емкость колонки.

Так как в ГХ, из-за использования исключительно капиллярных колонок из плавленного кварца, в распоряжении имеются стационарные фазы, лишь немного отличающиеся по полярности, то не может быть и речи о том, чтобы идентифицировать компоненты сравнением целенаправленно предварительно рассчитанных и реальных разделений, и информацию, которую не удастся получить вследствие близости времен удерживания, пытаются компенсировать применением идентифицирующих систем детектирования. Это является причиной того, почему применение находят почти исключительно капиллярные колонки с полидиметилсилоксановой стационарной фазой. Так как эта стационарная фаза может быть привита к внутренней стенке капилляра и проявляет к тому же наибольшую термостабильность, то она имеет наименьший фон, возникающий вследствие выноса фазы из колонки и прекрасно подходит для использования с масс-спектрометрическими детекторами. Источник ионов при этом больше не загрязняется



выносимыми продуктами, и колонки не нужно менять, так как они работают вплоть до предельных температур.

Таким образом в ГХ с самого начала применяется МС и/или ИК-Фурье-система, так как известно, что идентификация аналитов по данным удерживания на этих аполлярных колонках вряд ли возможна, а подтверждение с помощью второй полярной колонки слишком сложно или даже невозможно для пользователя. Собственные возможности хроматографии по идентификации соединений часто игнорируют в ГХ, чтобы не менять колонки или чтобы «произвести впечатление» с помощью дорогих и сложных детекторов.

В ВЭЖХ это наблюдается не так часто. Правда, также и здесь нет такого, чтобы идентифицировать соединения по предварительно рассчитанным данным, но все же существующие между подвижной и стационарной фазами взаимодействия используются достаточно целенаправленно. Напротив при ГХ во многих случаях вообще не стараются достичь полного разделения, а вместо этого пытаются провести на компьютере виртуальное «разделение», используя данные МС- или ИК-Фурье детектора.

Если сравнивать ВЭЖХ с ТСХ и ГХ, то можно отметить, что в ВЭЖХ, в сравнении с ГХ, не так много исследователей проводят их «разделения» виртуально, но если все же такое «разделение» проводится, то тогда в степени большей, чем это реально необходимо. Напротив, в ТСХ работают только экспериментально.

ВЭЖХ обеспечивает во многих случаях более надежный и более быстрый анализ, чем ГХ. Расходы на выполнение ВЭЖХ анализов сильно упали, тогда как затраты на ГХ анализы постоянно возрастают, так как почти каждый пользователь хочет использовать масс-селективный детектор, а не ПИД, который лучше подходит для количественного анализа.

Стоимость колонок также свидетельствует в пользу ВЭЖХ, нежели ГХ. При использовании в ВЭЖХ микроколонок пользователь имеет дополнительную возможность сэкономить на растворителях. Здесь имеется даже двойная экономия — во время анализа и при утилизации растворителей. Если включить теперь в сравнение и ТСХ, то с этим методом можно достичь такой стоимости анализа и скорости его выполнения, что остается неясным, почему сегодня ТСХ используется так мало.

Потребление растворителей колонкой с внутренним диаметром 4,6 мм при потоке 2 мл/мин составляет 220 л в год. Для колонки с внутренним диаметром 2,1 мм и потоком только 0,4 мл/мин в год потребление составляет лишь 44 л. При этом следует сравнивать не только закупочные цены, но и цены утилизации отходов. Особенно интересна здесь снова ТСХ, которая одновременно позволяет проводить без проблем несколько параллельных анализов (как правило, более десяти), используя лишь 3 мл растворителя.

«Капиллярные колонки» пока потому не так распространены сегодня, что большинство насосов в этой области потоков не дают надежно воспроизводимых градиентов. Другая помеха для широкого использования колонок диаметром 2,1 мм — это их незначительный рыночный ассортимент. Изократический анализ в ВЭЖХ можно сравнить с изотермическим анализом в ГХ. Если делятся сложные многокомпонентные смеси, то в ВЭЖХ можно использовать градиентное элюирование

(непрерывное изменение полярности подвижной фазы). В ГХ в распоряжении имеется метод программирования температуры.

4.11.1.2. Детекторы

Для ВЭЖХ имеется большее количество детекторов, чем для ГХ. Решающим недостатком ВЭЖХ однозначно является отсутствие ПИД. Преимущества детектора с диодной линейкой, а также детекторов по флуоресценции снижаются их не-универсальностью и, кроме того, их чувствительность оказывается, в большинстве случаев, в среднем на 3–4 порядка хуже, чем у ПИД. Рефрактометры настолько нечувствительны, что их едва ли можно применять.

Сегодня непосредственное сравнение с ГХ возможно благодаря комбинированию обоих методов с масс-спектрометрами. Решающим преимуществом ВЭЖХ/МС гибрида является возможность применения в области термолabileльных, реакционных и, прежде всего, высокомолекулярных соединений. Важную роль в ВЭЖХ/МС играют интерфейсы.

4.11.1.3. Приборы

Устройства ВЭЖХ и ГХ коммерчески доступны для всех приложений. Самодельки и перестроенные приборы, которые были типичны в прошлом, сегодня больше не нужны. Для ВЭЖХ имеются в наличии разнообразные комбинации систем ввода пробы, колонок, колоночных термостатов, детекторов и компьютеров. Таким образом, можно сконструировать оптимальный прибор.

В ГХ такая возможность полностью исключена, так как здесь все устройства управляются исключительно микропроцессорами. Поэтому комбинировать детекторы, термостаты и т.д., произведенные разными производителями, могут лишь немногие специалисты. В рутинной ГХ, между тем, это стало невозможным. Даже подключение рабочего компьютера к ГХ может быть проблематичным. Это обстоятельство является серьезным недостатком ГХ.

Стандартное оборудование для ВЭЖХ состоит из петлевого крана для ручного ввода пробы, градиентного насоса, детектора УФ/видимой области и компьютера. Как правило, дополнительно могут подключаться детектор с диодной линейкой, флуориметр и МСД. Заметного прогресса, в сравнении с ГХ, достигло проведение ВЭЖХ в автоматическом режиме. Постепенно появляются приборы для промышленной ВЭЖХ.

4.11.2. ВЭЖХ в экологическом анализе и анализе пищевых продуктов

ВЭЖХ анализ отдельных ингредиентов или групп веществ требует высоких затрат на пробоподготовку, принимая во внимание, что в большинстве случаев проба находится в сложной матрице. Издержки можно сократить, если в распоряжении имеются соответствующие селективные системы для разделения и детектирования. Значительную помощь при этом оказывает автоматическое управление системой от ввода пробы и градиентного элюирования до одновременного детектирования на нескольких длинах волн или одновременного использования нескольких разных детекторов [4.49].



На переднем плане анализа окружающей среды стоит анализ питьевой воды. Так как питьевую воду получают главным образом из поверхностных вод, то должны анализироваться и контролироваться как содержание ионных неорганических веществ, так и наличие следовых органических загрязнений. Важно, что такие анализы могут проводиться не только в соответствующих коммунальных и государственных лабораториях, но и то, что могут быть установлены надежные и автоматизированные измерительные станции, которые на месте обнаруживают и определяют содержание определенных загрязнений. Пример подобного рода — это контроль качества воды Рейна.

Для определения пестицидов в питьевой воде применяются как газохроматографические методы, так и методы жидкостной хроматографии. В то время как в ГХ достаточную чувствительность показывают только такие специальные детекторы, как ДЭЗ или АФД, то ВЭЖХ с УФ детектором может применяться более универсально. При использовании многоволнового детектора можно в одном хроматографическом разделении отслеживать более 30 подлежащих контролю веществ [4.50].

4.11.3. ВЭЖХ в лекарственном анализе

Основное применение ВЭЖХ находит при разработке, получении и контроле качества лекарств. Здесь можно выделить четыре области: ВЭЖХ как метод анализа при развитии синтетических или гомеопатических препаратов и как метод анализа в контексте клинических, токсикологических и фармакологических исследований. Основной задачей здесь является определение активных веществ и продуктов их превращений (метаболитов) в сложных матрицах (плазма, сыворотка, моча, секрет и т.д.), в которых они, конечно, присутствуют в незначительных концентрациях. Концентрации находятся, как правило, в области от микрограмм до нанограмм на миллилитр жидкости.

Особый интерес в области анализа активных веществ представляют хиральные соединения. Это вещества, которые существуют в двух оптически активных формах, которые с точки зрения их структуры соотносятся как картина и ее зеркальное отражение. Химически и физически они идентичны, и их можно различить только по специфическим взаимодействиям с другими хиральными соединениями. В рацемате обе оптически активные формы (энантиомеры) существуют в равном количестве (1 : 1). Тем не менее, энантиомеры могут отличаться друг от друга фармакологической активностью. Это должно быть установлено в ходе клинических и фармакологических исследований. Для этого нужны оптически чистые энантиомеры, которые можно получить либо стереоспецифическим синтезом, либо разделением рацемата. В течение последних лет для разделения рацематов были разработаны эффективные методы ВЭЖХ, которые используют специальные колонки с хиральными селекторами. Этими методами можно не только быстро аналитически разделить смесь энантиомеров, но проводить препаративные разделения с выделением соответствующих энантиомеров в килограммовых количествах.

Особое значение приобретает сегодня область анализа следов оптически активных соединений. В настоящее время клинические и фармакологические ис-

следования энантиомеров активных веществ предписаны законодательно. Из более чем 800 известных сегодня в Германии лекарственных веществ около половины являются хиральными веществами. Это показывает значение разделения энантиомеров с помощью ВЭЖХ. Определение чистоты является необходимым, так как содержание нежелательного энантиомера в основном продукте должно быть менее 0,1%. Поскольку пестициды нового поколения также часто хиральны, то здесь открывается большое поле деятельности для ВЭЖХ. Ввиду того, что методы энантиоселективного синтеза не так легко реализовать в промышленности, разделение энантиомеров хроматографическими методами может стать еще одной областью применения препаративной ВЭЖХ.

Актуальная область применения ВЭЖХ – это разработка современных лекарственных средств. Антисенснуклеотид рассматривается как лекарство будущего. При этом речь идет о полинуклеотидах, которые состоят, соответственно, из 20–30 оснований и могут тормозить синтез белка. Предпосылкой к синтезу такого антисенснуклеотида является знание структуры и анализ генома или, по меньшей мере, той его части, которая управляет соответствующими нуклеотидными последовательностями, ответственными за синтез белка.

ВЭЖХ и капиллярный электрофорез, в сочетании с масс-спектрометрическими методами, представляют для этого эффективный инструментарий, чтобы выделить синтетический антисенснуклеотид и охарактеризовать его свойства. С помощью полученных данных можно оптимизировать химические структурные элементы при синтезе этих материалов. Результаты служат также для того, чтобы понять механизм развития вирусных инфекций и других болезней и разработать соответствующие лекарственные препараты.

Сегодня все больше лекарств производится с помощью генной технологии. К чистоте таких продуктов, как, например, рекомбинантные белки, предъявляются высокие требования, прежде чем они будут выпущены на рынок. Еще несколько лет назад анализ этих препаратов стоил в высшей степени дорого, в ряде случаев даже чересчур дорого. С помощью ВЭЖХ/МС с ионизацией электрораспылением, например, белки могут быстро и надежно характеризоваться до молекулярных весов 100 000. При этом могут быть обнаружены даже небольшие «ошибки» в строении белка.

4.11.4. ВЭЖХ в биомедицинском анализе

Быстро развивающаяся область применения ВЭЖХ – это биомедицинский анализ и терапия. Химически и/или ферментативно специально подготовленные пористые носители позволяют интегрировать в систему ВЭЖХ проводимую все еще преимущественно вручную, а поэтому содержащую ошибки и дорогостоящую подготовку биологических жидкостей. Таким образом, удастся полностью автоматизировать обычное определение диагностически релевантных, фармакологически эффективных, а также токсикологически значимых веществ в рамках терапевтического лекарственного контроля и биологического мониторинга. Сорбенты, используемые в качестве материалов для заполнения предколонок, позволяют реализовать одновременно несколько механизмов разделения (эксклюзи-



онная хроматография и селективная адсорбционная или аффинная хроматография) и дают возможность осуществлять многократный ввод пробы и селективную динамичную экстракцию протеинсодержащих проб.

Применение хроматографических носителей для экстракорпоральной обработки плазмы или цельной крови человека является очень привлекательным в терапевтическом плане методом, на который обратили внимание лишь в последнее время. Селективное устранение патогенных компонентов крови предъявляет высочайшие требования (например, возможность стерилизации, химическую стабильность, био- или гемсовместимость) к применяемым сорбентам.

Представленные тенденции указывают направления, в которых совершенствуется исследование в этой области. Следующий также важный вопрос – это техническое улучшение компонентов системы ВЭЖХ и новые концепции интегрированных устройств.

4.11.5. Подготовка проб

Пробоподготовка, в частности, из матриц сложного состава, представляет все еще до конца не решенную проблему. Пробоподготовка требует больших временных и денежных затрат и должна поэтому автоматизироваться и интегрироваться в хроматографическую систему. Наряду с традиционной твердофазной экстракцией были предложены новые методы на основе мембран, электроосмоса и т.д., которые, однако, находятся еще в стадии развития. Другая концепция основывается на том, чтобы использовать очень селективные предколоники.

При биоанализе и фармацевтическом анализе к пробоподготовке предъявляются высокие требования, так как активные вещества, существующие в незначительных концентрациях, необходимо выделять и концентрировать из очень сложных матриц, таких как плазма или моча, содержащих большое количество примесей. Пробоподготовка, которую часто все еще проводят вручную, ведет к ошибкам, и в будущем она должна быть интегрирована в хроматографическую систему, а в рутинном анализе ее проведение должно быть полностью автоматизировано. Для этого вида пробоподготовки все чаще используются специальные селективные сорбенты, проявляющие двойственные хроматографические свойства.

Такие комбинированные фазы имеют высокогидрофобную внутреннюю поверхность относительно узких пор, где адсорбируются низкомолекулярные активные вещества, и гидрофильную внешнюю поверхность, которая не сорбирует белки. Такие предколоники позволяют многократный ввод пробы и селективную динамичную экстракцию низкомолекулярных активных веществ из проб, содержащих большое количество белка.

Для концентрирования компонентов проб определенных классов веществ часто используются очень специфические фазы с высокой избирательностью. Наряду с твердофазной экстракцией, все чаще применяемой в режиме онлайн, будут использоваться также новые технологии с мембранами, электроосмосом и др. Наука, конечно, еще довольно долгое время будет заниматься вопросами пробоподготовки, ее стандартизации и выработки общего оптимального алгоритма действий при концентрировании и выделении веществ.

4.11.6. ВЭЖХ колонки

На практике тенденции развития колонок определяются пользователями. Опыт показал, что попытки со стороны производителей убедить пользователей применить определенную новую технологию, даже если она была лучше старой, наталкивались большей частью на сопротивление. Поэтому многие производители очень сдержанно вкладывают средства в развитие новых колонок для ВЭЖХ. Они делают это только в том случае, если появляются определенная потребность и рынок сбыта. Все же постоянный интерес пользователей к новым колонкам вызвало в последнее время значительную перемену в технологии получения колонок. Большое внимание уделяется повышенной производительности колонок, улучшенной стабильности сорбента и их воспроизводимости. Большие успехи достигнуты в плане получения сорбентов на несиликагельной основе.

Многочисленные новшества в технологии получения колонок привели в последние годы к важным успехам в этой области. Колонки малого диаметра, капиллярные колонки и короткие колонки можно оптимально применять для определенных задач, что дает преимущества по сравнению со стандартными колонками. Разумеется, насосы и мертвые объемы для этих устройств должны быть соответственно миниатюризированы, а время отклика детектора сокращено и т.д.

Выделяются две тенденции развития разделительных колонок ВЭЖХ. Наряду со стандартными колонками, например, в ОФ хроматографии, в обращение входят во все возрастающей мере колонки, созданные для специальных задач, например, для определения полициклических ароматических веществ, катехоламинов, сахаров, разделения энантиомеров и т.д. Ввиду широкого применения колонок, например, в биоанализе активных веществ, к ним в процессе валидации метода или законодательных регламентов предъявляют все более высокие требования в плане воспроизводимости и стандартизации. Вместе с тем это означает, что внедрение новых стационарных фаз и колонок на рынок является медленным процессом, если только они не обладают какими-то исключительными свойствами и производительностью.

4.11.6.1. Другие фазы

В обращеннофазовой ВЭЖХ, которая применяется для примерно двух третей всех разделений, проводимых ВЭЖХ, доминирует сорбент С18. Наблюдается тенденция к использованию ОФ с более короткими жирными цепями С8, с одной стороны, поскольку они позволяют использовать элюенты с низким содержанием органической фазы, с другой стороны, на этой фазе многие классы веществ элюируются в середине шкалы удерживания, и, наконец, эти колонки часто имеют более высокую эффективность. Эта тенденция отражается в появлении запатентованных стерически защищенных С8, фенил- и цианофаз, которые проявляют высокую стабильность по отношению к агрессивным подвижным фазам. ОФ с еще более короткими алкильными группами все больше находят применение в ВЭЖХ для разделения белков и других биомолекул.

Другая тенденция — это использование стационарных фаз с функциональными группами, которые обеспечивают абсолютно другую селективность, чем ши-



рокоприменяемые алкильные лиганды. Выбор другой фазы особенно важен в тех separations, когда на селективность разделения не удастся повлиять, изменяя состав подвижной фазы.

Фенил- и цианопроизводные сорбентов – это самые перспективные кандидаты благодаря значительным различиям во взаимодействии со многими веществами. Большой интерес представляет разделение рацематов. Поэтому можно быть уверенным, что будут разработаны новые колонки с активными хиральными стационарными фазами. Новые хиральные колонки существенно стабильнее, с одной стороны, и значительно дешевле, с другой стороны, в рутинных условиях.

Можно предсказать, что возобновится интерес к нормальнофазовой хроматографии ввиду ее широкой области селективностей и превосходных свойств для препаративной хроматографии. Но прежде, чем это произойдет, должны быть созданы новые улучшенные адсорбенты. В настоящее время все немодифицированные адсорбенты дают неудовлетворительные и невоспроизводимые результаты. Большинство привитых нормальных фаз также показывают более низкую эффективность разделения и плохую форму пиков, чем соответствующие обращенные фазы.

4.11.6.2. Новые материалы

Без сомнения, силикагель останется предпочтительным материалом для многих типов сорбентов. Этот материал, обладающий прочной структурой, всегда может быть получен с большим разнообразием размеров частиц и пор, а также внутренней поверхности. Более того, новые сорбенты из очень чистого силикагеля могут обладать улучшенными поверхностными характеристиками, позволяющими эффективно разделять смеси таких биомакромолекул, как белки и пептиды.

Новые сорбенты на основе графитизированного углерода, оксидов алюминия, титана и циркония применяются в тех приложениях, для которых не подходят сорбенты на основе силикагеля. В ближайшем будущем нет оснований ожидать резких изменений в технологии приготовления колонок для ВЭЖХ. Будут наблюдаться лишь постепенные улучшения и изменения. Особый интерес в будущем будет проявлен к колонкам, заполненным улучшенными полимерными сорбентами. Вероятно, они позволят повысить еще дальше эффективность и воспроизводимость разделений, чем это было возможно до сих пор.

4.11.6.3. Миниатюризация

Медленно, но непрерывно развитие идет в направлении колонок с меньшим внутренним диаметром, так называемых микроколонок с внутренним диаметром от 1 до 2 мм. Это развитие инициируется преимущественно пользователями из области естественных наук, у которых для анализа в распоряжении имеются только ограниченные количества пробы. Напротив, другие пользователи заинтересованы в колонках малого внутреннего диаметра из-за необходимости сокращать расход растворителей. В будущем на первый план выйдут проблемы снижения издержек и утилизации отходов.

Колонки малого диаметра потому распространены еще не очень широко, что большинство насосов в этой области потоков не могут обеспечить надежное и

выпроизводимое создание градиента. Другое препятствие для распространения колонок диаметром 2,1 мм состоит в очень ограниченном ассортименте этих колонок на хроматографическом рынке.

Тем не менее, существует интерес к еще меньшим внутренним диаметрам, т.е. заполненным капиллярам с внутренним диаметром от 0,05 до 0,25 мм, которые в первую очередь должны использоваться в комбинации с масс-спектрометрами или похожими устройствами. Производители колонок должны разработать специальные методы их заполнения, чтобы колонки обладали оптимальной разделяющей способностью. Как следствие внедрения таких колонок можно ожидать улучшения всего оборудования для ВЭЖХ.

Возможность комбинирования с масс-спектрометрами – это единственная значимая причина заниматься миниатюризацией колонок. Что касается загрязнения окружающей среды при утилизации отходов смесей элюентов, то для колонок малого диаметра можно ожидать довольно широкий рынок, учитывая меньшее количество растворителей, необходимых при проведении разделений в ВЭЖХ на этих колонках. В отношении точности создания градиента и достижимых пределов обнаружения колонки диаметром около 2 мм могли бы стать разумным компромиссом.

Аналогично тенденции к уменьшению диаметра колонок наблюдается медленный тренд к заполнению колонок частицами меньшего размера, чем традиционно используемые сорбенты с размером частиц 5 мкм. Известно, что колонки, заполненные частицами размером меньше 5 мкм, обладают более высоким разрешением и требуют меньше времени при анализе. Однако на практике существуют определенные границы, до какого размера могут быть уменьшены размеры частиц. Наиболее существенное ограничение связано с приборами, которые имеются сегодня на хроматографическом рынке. Они не пригодны для того, чтобы реализовать разделяющую способность колонок, заполненных частицами размером 3 мкм. Для решения этой проблемы нужно создать приборы с чрезвычайно малым мертвым объемом и очень малым экстраколоночным размыванием. Первые шаги в этом направлении уже сделаны. Но потребуются определенное время, пока станет возможно рутинное применение колонок, заполненных адсорбентами с размером частиц от 1 до 2 мкм.

4.11.7. Детекторы

Прогресс в области детекторов в значительной мере зависит от прогресса в области гибридной техники. К значительным успехам привело комбинирование ВЭЖХ с масс-спектрометрией. Сегодня системы ЖХ/МС применяются для разработки лекарственных препаратов. Гибридизация с другими спектроскопическими методами находится в стадии развития. Преимущество комбинирования детекторов состоит в том, что оно позволяет получить дополнительную информацию о химической структуре разделяемых соединений.

Все чаще используются УФ детекторы с диодной линейкой. Непосредственным сравнением спектров можно улучшить достоверность качественного анализа и проверить чистоту наблюдаемых пиков. Обработка данных с помощью спе-



циальных программ облегчает стандартизацию анализа и помогает выполнять требования GLP и различных нормативов. Возможно, вследствие этого повысится достоверность анализа. Необходимость или стремление к универсальности различных программ обуславливает высокую сложность и объем систем, которые требуют большой объем оперативной памяти для компьютера.

4.11.8. Системы обработки результатов

Значение использования систем обработки данных в ВЭЖХ анализе постоянно возрастает, особенно с точки зрения достоверности результатов. Однозначно наблюдается тенденция к автоматизации (лабораторные автоматы и роботы). Здесь главную роль, прежде всего, играет экономия финансов, но важно также и улучшение воспроизводимости результатов. Правда, издержки на разработку метода и его оптимизацию оправдывает только проведение большого количества однотипных анализов в течение длительного периода времени.

Значение аналитических результатов в области экономики и общественной жизни привело к новому качественному уровню. Это значит, что формирование аналитических данных должно быть воспроизводимо и достоверно. Это отражено в нормах GLP, стандарте ISO 9000 и других законодательных актах. Вместе с тем это означает дополнительные издержки, которые, тем не менее, окупаются очевидным улучшением качества аналитических данных.

Для получения достоверных результатов разделяющую способность ВЭЖХ прибора необходимо регулярно проверять через четко определенные интервалы времени. Кроме того, следует проверять стабильность работы насоса, которая должна давать величину потока с отклонением не более 2%, линейность и правильность длины волн детектора и безупречную работу автодозировочного устройства. Для проведения тестовых процедур существует специальное программное обеспечение [4.51]. Наряду с этим нужно проводить проверку колонок, чтобы удостовериться в ее нормальном состоянии. Изменения в слое упакованного сорбента, которые зависят от количества введенных проб и типа матрицы, в которой они находились, сказываются на колебаниях времен удерживания.

4.11.9. Перспективы высокоэффективного анализа

На этот вопрос можно смотреть, естественно, с разных точек зрения. Капиллярный электрофорез в различных вариантах будет важным методическим дополнением к ВЭЖХ. Его преимущества заключаются в эффективном разделении смесей высокомолекулярных и ионных веществ. Различные версии и комбинации ВЭЖХ и КЭ находятся в стадии развития. Вопреки обширным проектно-конструкторским работам миниатюризация ВЭЖХ не привела к ожидаемому прорыву. Кажется, что лучшие перспективы здесь имеет КЭ. Если взглянуть в сторону больших количеств, то медленно, но непрерывно все большее значение приобретает препаративная ВЭЖХ или, лучше сказать, промышленная ВЭЖХ. Отчасти развитие метода произошло, конечно, независимо от аналитической ВЭЖХ, но все же опыты аналитической ВЭЖХ в значительной мере влились и в промышленную хроматографию.

В области селективного и чувствительного детектирования еще приходится констатировать значительное отставание. Приборы с диодной линейкой используются в рутинном анализе, и основное направление дальнейшего развития лежит здесь в комбинации ВЭЖХ с спектроскопическими методами, в особенности с масс-спектрометрией. Успехов можно ожидать и в области электрохимического детектирования.

Развитие лабораторных автоматов и роботов, вероятно, ускорится. Нужно надеяться, что в области автоматизированной пробоподготовки также будут достигнуты существенные успехи. Стремительное развитие ВЭЖХ как ключевого метода разделения и анализа в самых различных областях применения продолжится в течение следующих лет и даже в еще более разнообразных формах, чем раньше.

ГЛАВА 5

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Тонкослойная хроматография (ТСХ) стала известна в 1930 году в качестве так называемой микрохроматографии. Измаилов и Шрайбер использовали ее в 1938 году для разделения экстрактов природных соединений на оксиде алюминия. Расцвет тонкослойной хроматографии связан с именем Е. Шталя, который стал использовать силикагель с определенной внутренней поверхностью. В начале семидесятых годов сложилось впечатление, будто быстрые успехи в колоночной жидкостной хроматографии, КЖХ (англ.: Column liquid chromatography, CLC), в частности, в ВЭЖХ, приведут к вытеснению тонкослойной хроматографии. Однако ее название не должно вводить в заблуждение: ТСХ – это такой же метод жидкостной хроматографии, как и ЖКХ. Для нее справедливы те же самые хроматографические условия, что и в ВЭЖХ. С начала 1988 года выходит специальный журнал под названием «Планарная хроматография», посвященный исключительно этому методу. С начала восьмидесятых годов, благодаря внедрению новых и улучшенных методов работы, популярность ТСХ неуклонно растет [5.1].

В тонкослойной хроматографии (ТСХ, или англ.: TLC = Thin layer chromatography) смеси веществ разделяются путем распределения компонентов между подвижной жидкой и стационарной фазами, причем процесс разделения в отличие от колоночной хроматографии происходит в открытой системе – плоском слое. Стационарная фаза толщиной примерно 200 мкм находится в большинстве случаев на квадратной ровной пластинке, выполненной, например, из стекла. На нижний край пластинки микропипеткой наносят раствор разделяемой пробы. После испарения растворителя пластинку помещают в камеру для разделения, на дне которой находится подвижная фаза. Подвижная фаза поднимается вверх за счет капиллярных сил, проходит через стартовое пятно и захватывает при этом вещества, которые по-разному удерживаются на пластинке, поскольку они по-разному взаимодействуют со стационарной фазой.

Для подачи подвижной фазы не требуется никакого насоса, и подвижная фаза движется по сухой стационарной фазе просто за счет капиллярных сил. После того как фронт подвижной фазы прошел достаточное расстояние, пластинку достают из камеры и сушат. Разделенные вещества не покидают хроматографическую пластинку и определяются непосредственно на пластинке. Таким образом, речь идет о «внутренней» хроматограмме (т.е. разделенные компоненты остаются внутри стационарной фазы).

В ТСХ применяются те же стационарные фазы и соответствующие элюенты, что и в ВЭЖХ. Таким образом, существуют нормальные фазы с неполярными растворителями и обращенные фазы с полярными подвижными фазами. Здесь также применяются стационарные фазы с частицами различных размеров. При использовании частиц размером от 10 до 40 мкм речь идет о нормальной ТСХ, при

зернении от 3 до 10 мкм — о высокоэффективной ТСХ (ВЭТСХ) ввиду лучшей эффективности разделения.

ТСХ — это хроматографическая техника анализа, которую едва ли удастся пре-зойти в простоте, скорости и гибкости. Возможность исследовать много проб одновременно при незначительном расходе растворителя делает ее необходимым инструментом в ежедневной рутинной аналитике. Для количественных ТСХ сегодня в распоряжении имеются разнообразные приборы, которые, не в последнюю очередь из-за возможности автоматизации, находят также широкое приложение и в промышленных лабораториях [5.2]. Однако основное использование (примерно на 70%) лежит в области исследований и разработки.

Наряду со многими сходными чертами ТСХ обладает определенными отличиями по сравнению с другими хроматографическими методами разделения. Преимуществами ТСХ являются:

- одновременное разделение нескольких проб в абсолютно идентичных условиях;
- подготовка проб часто достаточно проста и не критична;
- результат разделения можно оценить визуально;
- специфическое определение и реакции дериватизации повышают избирательность метода;
- низкая стоимость анализов;
- простое и быстрое проведение разделений;
- большая гибкость хроматографических систем;
- хорошая воспроизводимость, поскольку пластинка используется только один раз;
- хроматограмма сохраняется на пластинке, что упрощает оценку результатов и их документацию;
- исключение опасности загрязнения благодаря однократному применению пластинки;
- минимальное потребление растворителя.

Особое внимание в ТСХ нужно обращать на то, что разделение в отличие от всех других хроматографических методов протекает в открытой системе. В колоночной хроматографии стационарная фаза находится в закрытой системе, которая постоянно омывается подвижной фазой. Обе фазы находятся при этом в равновесии: подвижная и стационарная фазы уравниваются. При ТСХ хроматографическая фаза находится сначала в атмосфере лаборатории. Уже здесь поверхностный активный слой может адсорбировать вещества из окружающей среды. Только после нанесения пробы стационарную фазу приводят в контакт с элюентом, и равновесие может не успеть установиться. Практически работают с «открытой колонкой», причем окружающая атмосфера влияет на хроматографическое разделение. Величина удерживания может оказаться разной, если, например, атмосфера камеры насыщена парами жидкой фазой (насыщение камеры) или если этого не происходит.

ТСХ в течение последних лет привлекла интерес, прежде всего, в Европе. Это связано с развитием приборостроения и автоматизации тех этапов ТСХ анализа,



которые в наибольшей степени подвержены появлению ошибок. Были развиты новые методы разделения, такие как градиентная система и система с принудительным потоком, а также комбинированные приборы с масс-спектрометрической детектированием, которые, конечно, применяются в онлайн-системах, управляемых микропроцессорами. Тем самым удалось заметно уменьшить ручную работу и устранить основные источники ошибок, что привело к улучшению воспроизводимости анализов и повысило привлекательность использования ТСХ/ВЭТСХ на практике.

В семидесятые годы интерес исследователей был преимущественно сконцентрирован в области совершенствования ВЭЖХ, вследствие чего ТСХ находилась как бы в тени. Новый взлет ТСХ начался из-за возросшей необходимости массовых анализов, которые полностью перегрузили бы ВЭЖХ. Массовые анализы встречаются, в частности, в экологическом анализе, в фармацевтической индустрии и в пищевой химии. Для большого количества проб ВЭЖХ абсолютно не подходит. ВЭЖХ работает последовательно, только одно разделение может проводиться в данный период времени. Всегда нужно ждать, пока все вещества покинут колонку. При ТСХ, напротив, многочисленные пробы могут разделяться одновременно в одинаковых условиях. Слой сорбента используется только однажды, вследствие этого отсутствует опасность старения или необратимой адсорбции вещества на стационарной фазе.

Условием полного использования преимуществ высокой производительности является автоматизация всех стадий разделения. Между тем техническое оснащение и целенаправленная автоматизация всех тех рабочих шагов, которые раньше были особенно подвержены ошибкам, за последнее время были существенно улучшены. Вместе с тем современная высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) не уступает по чувствительности остальным хроматографическим методам.

Из-за небольшой длины слоя, на котором происходит разделение (всего несколько сантиметров), ТСХ, в целом, следует считать техникой низкого разрешения. Но высокая специфичность детектирования компенсирует этот очевидный недостаток. Кроме того, ассортимент сорбентов был заметно расширен в последнее время, что позволяет лучше адаптировать хроматографическую систему к поставленной задаче, тем более что часто интерес представляет только ограниченная область полной хроматограммы. Это, естественно, требует увеличения селективности метода. Для экономии времени и растворителя могут использоваться ВЭТСХ пластинки меньших форматов. При этом, естественно, возникает желание использовать также сорбенты с меньшим размером зерна, тем более что уже коммерчески доступны готовые пластинки с тонкими слоями (100 мкм и 50 мкм). Они успешно применяются в области экологического анализа преимущественно для определения следовых количеств.

Селективность ВЭТСХ связана, с одной стороны, с развитием техники разделения, а с другой стороны, с возможностью комбинирования *in situ* с физическими методами измерения и определения. Часто для последующих исследований в распоряжении имеются только частично разделенные пробы. Тонкослойная пластинка – это двухмерный накопитель вещества. Следовательно, ТСХ особенно

хорошо подходит для идентификации и проверки чистоты, а также для количественного определения выделенных хроматографических пиков. Эти исследования поддерживаются развитием пред- и постколоночных микрохимических методов идентификации. Они служат, в частности, исследованию физиологического воздействия в нано- и пикограммовой области и приобретают поэтому все более широкое применение при исследовании метаболитов и в анализе окружающей среды.

Вопрос о том, лучше ли ТСХ, чем другие хроматографические методы, естественно, не возникает. Планарная и колоночная хроматографии дополняют друг друга. Простая методика ТСХ хорошо подходит для новичка в лабораториях, для быстрого контроля хода синтеза и для контроля лекарств в аптеке. Для повышенных требований к эффективности и воспроизводимости разделений есть коммерчески доступные высокопроизводительные системы, устройства нанесения проб, камеры разделения и детекторы, которые сравнимы по своим возможностям с другими методами. Тем не менее, это не секрет, что хотя для успешной практики ТСХ нужен минимум фундаментальных знаний и практического опыта, все же имеется много факторов, которые влияют на разделение в этой «открытой хроматографической системе».

5.1. ТСХ анализ

Проведение разделения в тонкослойной хроматографии можно разделить, по существу, на основной этап, факультативный этап и дополнительные мероприятия. Воспроизводимость результатов ТСХ – это существенный аспект, принимая во внимание растущие требования ко всем методам анализов достижения возможно меньшего разброса получаемых значений и правильности результатов. Собственно ТСХ анализ всегда состоит из трех шагов:

- нанесение пробы,
- хроматографическое разделение и
- количественная оценка.

К факультативным мероприятиям относят предварительную промывку слоя сорбента, пред- и постхроматографическую дериватизацию и предкондиционирование. Во многих случаях эти операции благоприятно сказываются на возможностях обнаружения, избирательности, а также и воспроизводимости анализа. Дополнительные мероприятия включают прежде всего оптимизированную для данной задачи пробоподготовку, которая должна выполняться перед нанесением пробы, а также целенаправленный выбор типа пластинки и растворителя. Составными частями этой процедуры часто являются также проверка разделения в УФ свете и документация хроматограммы.

Очень экономичный по сравнению с ВЭЖХ из-за отсутствия насоса и простого нанесения пробы капилляром процесс тонкослойной хроматографии, тем не менее, больше не удовлетворяет высоким требованиям современной инструментальной аналитики. Приобретение эффективного устройства для обработки и количественной оценки данных ТСХ, денситометра и периферии, соответству-

ющей поставленной задаче, является своего рода платой за вход для этого высокопроизводительного аналитического метода. Полные возможности количественной обработки результатов можно реализовать только тогда, когда инструментальное оснащение для обработки данных предшествующих этапов также соответствует этому стандарту. Но прежде всего необходимо выбрать сорбент для разделяющего слоя.

5.2. Стационарные фазы (сорбенты)

Развитие коммерчески доступных сорбентов воспроизводимого качества и свойств было существенной предпосылкой для распространения ТСХ как рутинного метода. Если ТСХ применяется для контроля качества, то воспроизводимость результатов анализов должны подтверждаться минимальным разбросом результатов и их правильностью. Это означает, что метод должен быть проверен на линейность, селективность, пределы обнаружения и надежность. Воспроизводимость хроматографических свойств готовых пластинок для ТСХ и ВЭТСХ гарантируется контролем качества пластинок при их разработке, производстве и сбыте [5.31].

На практике большинство задач можно решать с помощью небольшого числа сорбентов, если использовать селективность элюентов. Для определенных проблем разделения можно обратиться к модифицированным сорбентам со специфической селективностью, так как это позволит избежать больших затрат для определения оптимальных условий разделения. Основные свойства сорбентов и их свойства описаны в последующих трех разделах.

5.2.1. Химический состав и структура

Все сорбенты подразделяют, как и в ВЭЖХ, на два типа:

- полярные (гидрофильные) фазы, также прямые или нормальные фазы,
- неполярные (липофильные) фазы, также обращенные фазы.

Существуют также среднеполярные фазы, в большинстве случаев это модифицированные сорбенты с циано-, диол- и аминогруппами. В зависимости от используемых элюентов они обнаруживают отчасти свойства нормальной, а отчасти свойства обращенной фазы.

Полярные фазы комбинируются, как правило, с такими неполярными подвижными фазами, как смесь хлороформ/метанол, обращенные фазы, напротив, используются с водными элюентами. При переходе от нормальной фазы к обращенной, естественно, обращается последовательность элюирования. Особенно на практике распространены силикагель, оксид алюминия и целлюлоза.

5.2.1.1. Силикагель

Силикагель — это аморфный, водосодержащий оксид кремния, пронизанный бесчисленными каналами и пустотами. Поверхность отдельных каналов и пустот дает в итоге так называемую внутреннюю поверхность. Она может достигать у искус-

ственно полученного активного силикагеля (называемого также кизульгуром) величины до $850 \text{ м}^2/\text{г}$ [5.4]. Его получают из жидкого стекла осаждением серной кислотой, причем условия осаждения и обработки придают силикагелю его специфические свойства. Тщательное соблюдение условий изготовления и последующего дробления и просеивания силикагеля исключительно важны для единообразия отдельных партий кизельгура. Изменение гранулометрического состава иногда ведет к сильным колебаниям результатов разделений.

Преобладающая часть всех разделений проводится на силикагеле. При этом речь идет о пористом, аморфном порошке с диаметром пор от 50 до 100 Е. Его поверхность содержит Si—ОН группы, которые способны образовывать водородные мостики друг с другом или с полярными веществами. Наибольшее количество доступных Si—ОН групп и, вместе с тем, наивысшей активностью обладает силикагель, активированный при 150°C . При такой обработке он теряет адсорбированную воду и имеет от 4 до 6 Si—ОН групп на 10 нм^2 .

Адсорбционная хроматография использует немодифицированный силикагель. Удерживание анализов происходит преимущественно при взаимодействии их полярных групп с силанольными группами на поверхности кремния. Полярные анализы могут вступать в сильные взаимодействия с поверхностью силикагеля, из-за чего могут возникать плохо разделенные зоны. Поэтому адсорбционная хроматография применяется для умеренно полярных растворимых в органических растворителях веществ. Типичным недостатком адсорбционной хроматографии является сильное влияние на разделение следов воды в растворителе. Вода адсорбируется на поверхности силикагеля и деактивирует силанольные группы.

То, что силикагели разных производителей имеют различную разделяющую способность, связано с разным зернением, разной величиной поверхности, разным типом силанольных групп, а также формой частиц и размером пор. Коммерчески доступные силикагели имеют частицы либо сферической, либо нерегулярной формы. Силикагель нерегулярной формы получают из крупнозернистого материала дроблением, рассеиванием на ситах и в воздушном классификаторе, что существенно удешевляет получение. Сферический силикагель получают в результате специальных дорогостоящих процессов. Сферические частицы позволяют лучше сформировать разделяющий слой, однако это преимущество можно реализовать, только если распределение частиц по размерам находится в возможно более узком диапазоне.

5.2.1.2. Оксид алюминия

Наряду с силикагелем предлагаются пластинки с Al_2O_3 . Следует обратить внимание, что в продаже есть кислый, нейтральный, а также основной оксид алюминия. Производство таких оксидов алюминия происходит путем дегидратации гидроксида алюминия. После обезвоживания оксид нужно как можно быстрее герметично расфасовывать. Оксиды алюминия являются высокоактивными сорбентами. Тем не менее, они очень быстро теряют активность, если контактируют с влагой из воздуха. Для разделения в основном используются неполярные растворители, так что преимущественно речь идет об адсорбционной хроматографии.

5.2.1.3. Целлюлоза

ТСХ на целлюлозе как продолжение бумажной хроматографии особенно подходит для полярных веществ (углеводов, карбоновых кислот). В качестве сорбентов служат естественная или микрокристаллическая целлюлоза в форме волокна. Немодифицированный порошок целлюлозы применяется только для качественных разделений и очистки. В большинстве случаев используются ацетилпроизводные целлюлозы с разной степенью ацетилирования. С ростом степени этерификации гидрофобные качества возрастают. Тем не менее, выбор растворителя сильно сужен из-за растворимости ацетилцеллюлозы. Целлюлоза может применяться также в виде диэтиламиноацетилцеллюлоза или полиэтилениминцеллюлоза как анионообменный сорбент для ТСХ разделения, например, нуклеиновых кислот [5.5].

5.2.1.4. Полиамид

Полиамид как стационарная фаза применяется преимущественно для разделения производных фенола, но на нем могут быть успешно разделены также аминокислоты и полициклические ароматические углеводороды. Между фенольными гидроксильными и амидными группами образуются водородные связи. Также водородными мостиками связываются с полиамидной фазой и карбоновые кислоты. Сродство к полиамиду у монокарбоновых кислот выражено достаточно слабо, но у дикарбоновых кислот и ароматических кислот оно выражено значительно сильнее.

В качестве стандартных носителей предлагаются полиамиды типа перлона и нейлона. Перлон — это поликапролактан (полиамид 6), нейлон — полигексаметилендиаминадипинат (полиамид 66). Вследствие сшивок, образующихся за счет водородных мостиков, они довольно трудно растворимы в гидрофильных растворителях, однако еще способны к набуханию. Полиамид применяется для выделения и структурного анализа различных фенольных природных соединений. Наряду с количеством и положением гидроксильных групп в ароматическом соединении на сродство фенола к полиамиду значительно влияет использованный растворитель. В зависимости от способности растворителя конкурировать с фенолом за образование водородных связей и от его сродства к веществу, адсорбированному полиамидом, может происходить быстрая десорбция вещества.

На полиамиде можно разделять также многочисленные нитроароматические производные. Взаимодействие нитропроизводных с полиамидом соответствует реакции льюисовых кислоты и основания, поэтому разделение нитроароматических веществ может рассматриваться как ионный обмен. Однако узкие зоны вещества получаются только при использовании в качестве элюента буферных растворов.

5.2.1.5. Обращеннофазовая ТСХ

Алкилирование силанольных групп силикагеля приводит к так называемым обращенным фазам. В то время как в нормальной ТСХ стационарная фаза всегда является более полярной, чем подвижная фаза, у обращенных фаз это соотношение обращается. При этом гидрофобность растет с ростом длины углеводородных

цепей. Так же, как ВЭЖХ, используются этильные (C2, ОФ2), октильные (C8, ОФ8) или октадецильные группы (C18, ОФ18).

В качестве элюентов используются, прежде всего, водные смеси метанола и ацетонитрила. Удерживание разделяемых веществ зависит от содержания воды в органическом растворителе. С ростом содержания воды время разделения значительно возрастает до тех пор, пока, наконец, элюирование вообще не прекращается. Разделение в обращеннофазовом режиме можно легко оптимизировать изменением подвижной фазы. С ростом доли органического растворителя в элюенте удерживание уменьшается. В общем случае считается, что с ростом полярности молекул пробы должна возрастать доля воды в подвижной фазе.

5.2.1.6. Специальные покрытия

Развитием обращеннофазовых материалов явилось внедрение специальных модифицирующих заместителей. Выбором функциональных групп можно варьировать химические свойства поверхности и, тем самым, сорбционные свойства стационарной фазы аналогично тому, как в распределительной хроматографии. Так как при этом, однако, привитой слой состоит из органических мономеров, такие фазы отличаются быстрым массообменом.

Так, аминогруппы обладают слабоосновными ионообменными свойствами и подходят, таким образом, для разделения фенолов, нуклеозидов, карбоновых или сульфокислот. Сорбенты гидрофильного характера с промежуточной полярностью представлены силикагелем с цианопропильными группами и подходят для разделения аминов, алкалоидов, фенолов и консервантов.

Наконец, есть также силикагель с хиральными (оптически активными) функциональными группами. Благодаря образованию диастереомеров такая фаза способна разделять оптически активные вещества на энантиомеры. Современный синтез аналогов природных соединений и лекарственных веществ требует тщательного контроля чистоты энантиомеров, так как различные энантиомеры могут иметь абсолютно разное фармакологическое действие и поэтому должны исследоваться отдельно.

5.2.2. Характеристики зернения и пористости

Хроматографическая эффективность сорбента, которая проявляется в форме образования более или менее компактного пятна вещества, определяется его геометрической структурой. Кроме того, важны также размер зерна и распределение частиц по размерам. Напротив, селективность сорбента зависит от химической структуры материала.

Чем меньше размер частиц и чем более узкое распределение частиц по размерам, тем выше эффективность разделения.

Диаметр частицы стандартных силикагелей лежит в области от 5 до 40 мкм. В зависимости от зернения сорбента ТСХ подразделяют на:

ТСХ, если размер зерна лежит между 10 и 40 мкм,

ВЭТСХ, если диаметр зерна составляет 3, 5, 7 или 10 мкм.



Меньший диаметр зерна в ВЭТСХ способствует лучшей эффективности разделения. Тем не менее, с частицами несколько больших размеров часто еще достигают хорошей эффективности разделения при меньшем времени анализа. Большая поверхность означает более интенсивное взаимодействие между пробой и стационарной фазой и, вместе с тем, большую силу адсорбции, а потому и более сильное удерживание. Поверхность стандартных силикагелей составляет от 400 до 600 м²/г. Типичная величина объема пор — это 0,8 мл/г, типичная величина диаметра пор — 100 нм.

5.2.3. Параметр слоя

Толщина слоя для аналитической ТСХ составляет около 250 мкм, в ВЭТСХ — около 200 мкм. Для препаративного разделения предлагаются готовые пластинки с толщиной слоя от 0,5 до 2 мм. Вещества можно выделить вырезанием разделенных зон и экстракцией или вымыванием вещества специальными элюентами. Затем они могут использоваться для следующих исследований.

На качества слоя влияют также связующие, например, гипс, которые повышают устойчивость и прочность слоя.

5.2.4. Готовые пластинки

Первоначально пластинки, необходимые для ТСХ, делали сами пользователи. Все же сегодня для количественных определений практически исключительно используются готовые пластинки, производимые промышленным способом, так как они имеют значительно более равномерное покрытие. Хотя стекло широко распространено как подложка для ТСХ пластинок, недорогой альтернативой являются полиэфирные пластинки (ПЭФ). Они обладают гибкостью, их можно резать при помощи ножниц и нагревать для проявления пятен вплоть до 160 °С. Преимуществом пластинок из алюминиевой фольги является еще более высокая термическая устойчивость. Тем не менее, использование концентрированной минеральной кислоты или аммиака с алюминиевыми пластинками недопустимо.

В противоположность ВЭЖХ, где преобладающее число разделений проводится на обращенной фазе, в ТСХ в качестве стационарной фазы в основном используется силикагель. Для количественной работы практически используются только стеклянные пластинки. Наряду с традиционными пластинками большинство производителей предлагают также пластинки, покрытые более мелкозернистыми и имеющими более узкое распределение частиц по размерам сорбентами. Использование этих новых готовых пластинок в комбинации с улучшенной техникой нанесения и проявления позволяет получать отличные и воспроизводимые результаты, сравнимые с ВЭЖХ, и таким образом, по праву говорить о высокоэффективной тонкослойной хроматографии (англ.: HPTLC, High performance thin-layer chromatography).

Обычный формат готовых пластинок — 20 × 20 см, для ВЭТСХ — 10 × 10 см. Современные готовые пластинки отличаются, наряду с гомогенностью покрытия, равномерной толщиной, прочностью и высокой плотностью слоя. Такие пластинки в течение определенного периода сохраняют хроматографические качества неизменными. Нужно обращать внимание на то, что разные производите-

ли используют различные связующие, что приводит к разным хроматографическим свойствам пластинок.

Оптимальный наносимый объем пробы составляет для нормальных пластинок с силикагельным покрытием около 0,5 мкл (максимально до 2 мкл), для высокоэффективных пластинок (ВЭТСХ- или наноТСХ) — от 100 до 200 нл (максимально до 500 нл). Пластины ВЭТСХ, при правильном использовании, отличаются более высокой разделяющей способностью и более коротким временем анализа. Граница обнаружения, определяемая по концентрации наносимого раствора, улучшается при этом лишь незначительно.

В продаже имеются также пластины с концентрирующей зоной. Концентрирующие зоны (зоны нанесения) имеют ширину примерно 20 мм и состоят из очень крупнопористого силикагеля. Разделения здесь практически не происходит, и все нанесенные вещества в виде тонкой стартовой полосы концентрируются у границы двух зон, и только затем начинается хроматографическое разделение. Линия старта для хроматографии — это граница между концентрирующей зоной и хроматографическим слоем. Это позволяет сохранить небольшой размер стартового пятна и улучшает разделение.

5.3. Подготовка пластинок

В противоположность колоночной хроматографии, в которой стационарная и подвижная фазы находятся в состоянии равновесия, в ТСХ речь идет об открытой системе. Хроматографический слой уже перед аналитическим разделением находится в контакте с окружающим воздухом. На поверхности сорбента находится множество активных центров. На этих активных центрах могут адсорбироваться вещества. Количество адсорбированных веществ и прочность адсорбционных взаимодействий в обычных условиях зависят от прочности связывания и числа активных центров. Чем больше оба вклада, тем выше в целом активность сорбентов и, вместе с тем, удерживающая способность стационарной фазы.

Высокая активность стационарной фазы вызывает более сильную адсорбцию веществ и ведет вместе с тем к более короткому пути пробега. Равновесие адсорбции (и вместе с тем активность) зависит, как любое настоящее равновесие, от давления и температуры. Изменения давления и температуры ведут к тому, что вода либо присоединяется, либо, наоборот, десорбируется. Уже в процессе нанесения пробы вода из воздуха может локально меняться активность сорбента.

5.3.1. Активация

Адсорбция на поверхности сорбента деактивирующих соединений понижает его активность. Как правило, речь идет о полярных веществах. Деактивация обычных ТСХ пластинок обычно происходит вследствие адсорбции водяного пара из воздуха, когда полярные молекулы воды связываются с активными центрами сорбента и уменьшают его активную поверхность. Равновесие сорбции-десорбции воды из воздуха, которое зависит от относительной влажности воздуха, устанавливается за несколько минут.



Так как подготовка пластинок и нанесение пробы, как правило, занимают больше времени, то активность сорбента после несения пробы определяется в основном относительной влажностью воздуха в лаборатории.

Воспроизводимые хроматографические результаты получаются только при соблюдении воспроизводимых условий. Полностью кондиционированная комната с циркуляцией воздуха позволяет поддерживать постоянную активность адсорбционного слоя. Иногда пластинку все же приходится активировать. Особенно это может быть необходимо в тропических странах, если требуется воспроизводимость разделения. Важно, чтобы сравниваемые вещества хроматографировались на такой же ТСХ пластинке, как и сама проба.

5.3.2. Хранение и очистка

Сорбенты с большой поверхностью адсорбируют наряду с водой также все другие пары, которые присутствуют в лабораторном воздухе. На пластинках, которые долго находились незащищенными на воздухе, получаются «грязные» зоны (обычно вблизи фронта растворителя), и при этом страдает воспроизводимость результатов.

Поэтому пластинки необходимо хранить в газонепроницаемых кассетах, которые защищают их от лабораторного воздуха и тем самым от загрязнений.

Из-за сорбционной активности сорбент всегда содержит небольшое количество загрязнений, которые приходят из окружающей среды. Поэтому в большинстве случаев необходимо пластинки предварительно промывать. Для очистки, как правило, через пластинку один раз пропускают смесь хлороформ/метанол (1 : 1) или используемый в дальнейшем элюент, причем дают подняться фронту выше, чем это планируется для собственно разделения.

5.4. Подвижная фаза

Наряду с сорбентами и (при гидрофильных сорбентах) их активностью на разделение оказывает влияние выбор растворителя для элюирования. Элюент смывает разделяемые вещества с сорбента и переносит их дальше. Чем сильнее адсорбируется сам элюент, тем больше его вытесняющая сила. Если вещество обладает большим сродством к элюенту, чем к сорбенту, то оно элюируется ближе к фронту. Чтобы получить воспроизводимые результаты, следует использовать только очень чистые растворители.

В открытой ТСХ системе элюент может иметь другой состав, чем хроматографически эффективная подвижная фаза, потому что и элюент подвергается хроматографическому процессу. Особенно заметен этот эффект у многокомпонентных элюентов: у них наблюдаются так называемые « β -фронты», которые вызваны разными скоростями миграции отдельных растворителей, составляющих элюент.

Например, « β -фронт» встречается, если хроматографию проводят со смесью циклогексана и эфира на силикагельной пластинке. При этом движение полярного эфира хроматографически замедляется, так что в области фронта движется один циклогексан и лишь на некотором удалении от фронта можно обнаружить

смесь из циклогесана и эфира. На этом месте существует скачок полярности в составе подвижной фазы, который обозначают как « β -фронт». Вследствие этого, в эту область сдвигаются все менее полярные вещества, которые не смываются чистым циклогексаном. Описанный феномен дополнительно перекрывается эффектами испарения и насыщения.

5.4.1. Насыщение камеры

Насыщение атмосферы камеры парами растворителя сильно влияет на результат разделения. Если атмосфера камеры не насыщена, то растворитель во время хроматографии испаряется из тонкого слоя сорбента, так что для того, чтобы он поднялся на определенное расстояние, нужно большее количество растворителя. Время хроматографирования вследствие этого значительно увеличивается. Испарение растворителя с пластинки происходит преимущественно в области фронта движения подвижной фазы. Рис. 5.1 схематически показывает, что происходит в камере без насыщения, когда пластинка помещается в только что налитый растворитель.

При элюировании многокомпонентной смесью сначала испаряются более летучие компоненты. Если в камеру помещают фильтровальную бумагу, пропитанную элюентом, то пары растворителя вскоре распределяются равномерно в паровой фазе и камера будет насыщена. Если пластинку устанавливают в такую камеру, то сухой слой будет уравновешен элюентом, и количество растворителя необходимое, чтобы фронт прошел то же самое расстояние, будет меньше.

При работе без насыщения камеры получают несколько более узкие пики, чем при насыщении камеры. Различия в величине пробега в сухой и насыщенной камере, тем не менее, только мнимые. В первом случае через слой сорбента прохо-

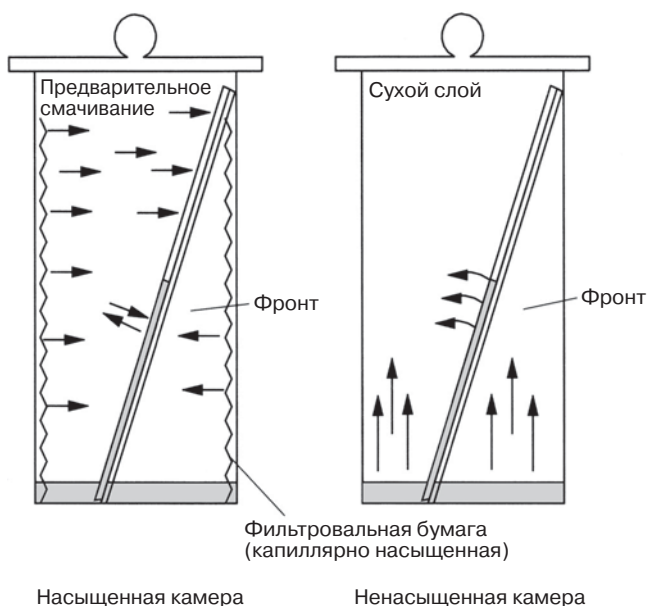


Рис. 5.1. Влияние атмосферы в камере на ТСХ



дит больше растворителя, чем это соответствует длине пробега фронта растворителя. Во втором случае растворитель из газовой фазы конденсируется перед настоящим фронтом и создает видимость большей длины пробега.

5.5. Подготовка проб

В первом приближении пробоподготовка при тонкослойной хроматографии не настолько критична, как в колоночной хроматографии, так как пластинка используется однократно. Однако в некоторых случаях, например, при анализах следов или проб со сложной матрицей, пробы нельзя наносить непосредственно на пластинку, а нужно провести предварительную очистку и/или обогащение (англ.: clean-up). Из исследуемого материала посредством, например, экстракции, дистилляции, сублимации или осаждения получают исходную пробу, которая перед последующим хроматографическим разделением может подвергаться дальнейшей очистке. Это должно приводить к выделению подлежащих разделению веществ по групповому или специфическому для этой группы веществ признаку. В табл. 5.1 приведены самые важные этапы очистки.

Многие этапы подготовки приходится находить и оптимизировать эмпирически. Каждая ошибка при пробоподготовке распространяется потом через весь анализ вплоть до конечной хроматограммы. Вспомогательные вещества для пробоподготовки и используемые растворители должны быть абсолютно чистыми. Следует готовить достаточное количество вещества, чтобы иметь возможность для

Таблица 5.1. Стадия очистки

Обозначение	Описание	Указания и рекомендации
Растворение	Прямое разделение посредством вымывания основных компонентов (простая экстракция)	Растворитель затем должен быть удален
Жидкость-жидкостная экстракция	Проба распределяется между двумя несмешиваемыми растворителями. Матрица пробы концентрируется в одном, а аналит – в другом растворителе	Метод требует хороших знаний химии. Компоненты пробы должны быть известны
Твердофазная экстракция	Экстракция на готовых колонках а) наполненных силикагелем, элюирование органическими растворителями позволяет отделить все липофильные вещества б) наполненных обращенной фазой, элюирование водными растворами способствует отделению всех гидрофильных соединений	Все обычные методы экстракции заменимы на этот метод, при этом экономятся растворители, материалы и время
Специальные ТСХ пластинки	ТСХ пластинки с концентрирующей зоной обеспечивают концентрирование наносимой смеси в более узкую полосу, исполняя иногда также функцию очистки, при которой отделяются мешающие компоненты	Фокусировка особенно удается при адсорбционном разделении
Дериватизация	Химическое превращение соответственно решаемой задаче для изменения хроматографических свойств аналита	Имеет преимущество тогда, когда разделение производного легче, чем самой пробы
Колоночная хроматография	Предварительное разделение смесей ионообменной, адсорбционной или распределительной хроматографией на обычных колонках	Дальнейшая обработка зависит от степени чистоты, возможно прямое комбинирование ВЭЖХ-ТСХ

контрольных исследований (двойные определения и повторные определения). В частности, неустойчивые пробы после подготовки нужно хроматографировать как можно скорее. На одну ночь пробу можно оставить в холодильнике, на более длительное хранение — в морозильном шкафу.

5.6. Нанесение проб

Из разделяемой смеси веществ готовят раствор подходящей концентрации, причем для этого в первую очередь подходят такие растворители, которые сами обладают невысокой элюирующей силой. Растворенная проба наносится на линию старта, которая находится примерно на 1–2 см выше края тонкослойной пластинки. Стартовые пятна нужно делать как можно меньшего диаметра. Самые важные критерии для нанесения пробы:

- точность дозированного объема должна быть выше или равна 1%;
- позиционирование нанесенных зон должно быть настолько точным, чтобы была возможна последующая автоматическая обработка результатов;
- зоны нанесения должны быть как можно более компактны;
- хроматографический слой нельзя нарушать при нанесении пробы.

Различные фирмы предлагают специальные устройства для нанесения проб от простых трафаретов для нанесения вручную до полностью автоматизированных автодозаторов. Нанесение может быть точечное или полоской, как представлено на рис. 5.2. В общем случае уширение зоны нанесения в направлении движения растворителя оказывается при нанесении в форме полоски меньше, чем при точечном. Раньше нанесение пробы в виде полоски делали специальной широкой пипеткой. Она состоит из двух прямоугольных стеклянных дисков, которые находятся в держателе и включают параллельную боковой стороне капиллярную щель, которая автоматически заполняется при помещении в раствор вещества. С помощью этой пипетки пробу наносят на старт тонкой полоской перпендикулярно к направлению движения элюента.

Сегодня нанесение пробы в форма полоски проводят с помощью капилляра, причем во время нанесения ТСХ пластинка движется в автоматическом устройстве вперед и назад перпендикулярно к направлению движения элюента. С помощью этой техники большие объемы пробы до нескольких мкл могут наноситься также и в ВЭТСХ.

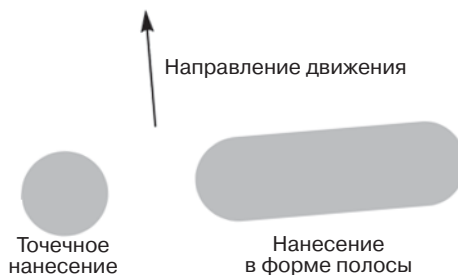


Рис. 5.2. Сравнение нанесения пробы в форме пятна и в форме полосы

Для калибровки можно без проблем наносить разные объемы. Допускается нанесение раствора стандарта поверх нанесенной полоски пробы. Нанесение пробы в форме полоски обеспечивает наилучшее разделение, которое достижимо с помощью данной хроматографической системы, так как смеси, нанесенные в форме полоски, в большинстве случаев удается лучше разделить и точнее обработать. Недостатком является то, что на одну пластинку можно нанести только несколько полос.

Пробу и стандарты следует растворять в одинаковых растворителях. После нанесения растворитель или смесь растворителей полностью удаляется, причем скорость испарения можно существенно увеличить при помощи обдува воздухом. При этом нужно обращать внимание, что локальные изменения концентрации в пятне могут быть вызваны асимметричным испарением растворителя.

В этой связи здесь нужно еще раз указать на то, что на обычные пластинки наносится от 0,5 до 5,0 мкл объема пробы. Для пластинок ВЭТСХ объем пробы 0,5 мкл представляет уже верхнюю границу, а обычно наносят от 100 до 500 нл пробы. Концентрация пробы лежит в общем случае между 0,01% и 1%. Чем лучше разделяющие свойства пластинки, тем большее влияние на результаты разделения имеет качество нанесения пробы, т.е. важно иметь по возможности меньшее уширение стартовой зоны. Стартовые пятна не должны превосходить в диаметре примерно 5 мм при ТСХ и 1–2 мм при ВЭТСХ. Нужно избегать нанесения пробы частями, так как при каждом дополнительном нанесении предыдущая зона будет хроматографироваться. Тем не менее, если пробу все же нужно наносить в несколько приемов, то растворитель между отдельными нанесениями следует испарять.

Ручное нанесение пробы уже не соответствует этим требованиям. Рис. 5.3 показывает нанесение пробы вручную с трафаретом. После наложения трафарета нанесение пробы производится с помощью стьянного капилляра в V-образные углубления шаблона. При таком ручном нанесении пробы следует обращать внимание на то, чтобы не повредить слой сорбента. Капилляр должен только касаться слоя сорбента, и проба вытекает из него под действием капиллярных сил.

Нанесение проб при количественных определениях занимает, по меньшей мере, от 30 до 60% времени анализа. Стоит оптимизировать эту технологическую опера-

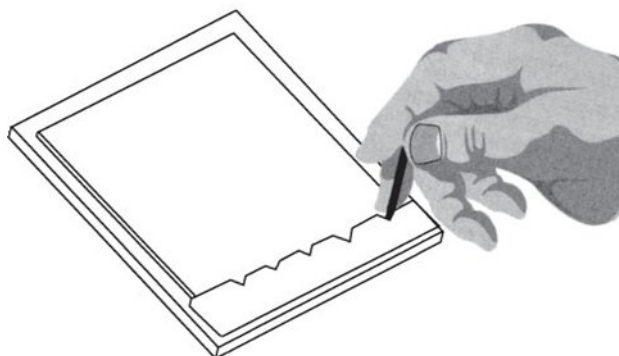


Рис. 5.3. Ручное нанесение пробы

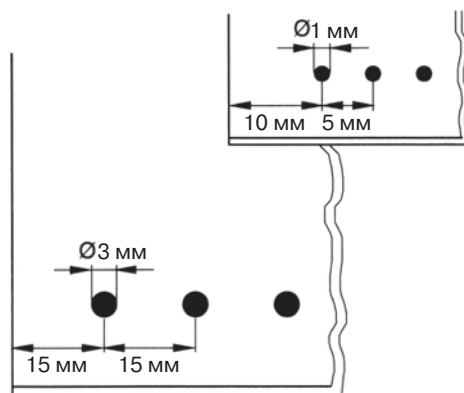


Рис. 5.4. Схема практического нанесения пробы

цию и использовать нужные устройства. В общем, в ТСХ на проблему и источник ошибок при нанесении пробы на пластинку обращают слишком мало внимания. В зависимости от поставленной задачи может использоваться соответственно капиллярный дозатор, шприцевая система нанесения или прибор для нанесения пробы в форме полосок. Большие объемы пробы лучше наносить в виде протяженной полоски. Нанесение в форме полоски улучшает качество разделения и уменьшает определенные систематические ошибки при денситометрической оценке результатов.

При нанесении пробы с помощью капилляров только капиллярные силы слоя сорбента вызывают вытекание раствора пробы. В случае дозирования шприцем речь идет о принудительном дозировании. В обоих случаях устройство нанесения пробы обеспечивает как точное позиционирование, так и автоматическое опускания дозатора на слой.

Практичная схема нанесения пробы показана на рис. 5.4, наверху — для ВЭТСХ пластинки, внизу — для обычной ТСХ пластинки. Как правило, пятна вещества наносят на расстоянии 15 мм, при ВЭТСХ — на расстоянии 5 мм. Отклонение в 0,1 мм при позиционировании пробы при автоматической обработке хроматограмм либо потребует дополнительного времени, так как будет необходима оптимизация распознавания пика, либо снизит точность определения.

5.6.1. Нанесение пробы с помощью капилляра

Благодаря использованию одноразовых капилляров избегают опасности загрязнения пробы. На рис. 5.5 показан автомат для нанесения проб, который гарантирует точное позиционирование капилляра при нанесении пробы без повреждения хроматографического слоя. Одноразовые капилляры вставляются в держатель для капилляров и заполняются погружением конца капилляра в раствор пробы.

Затем капиллярная пипетка с держателем помещается в устройство для нанесения пробы. Капилляр автоматически опускается на поверхность слоя сорбента с помощью пружинного механизма с регулируемой скоростью опускания, опорожняется и возвращается по истечении заданного времени контакта с поверхностью в исходное положение. Доступны капилляры с номинальными объемами

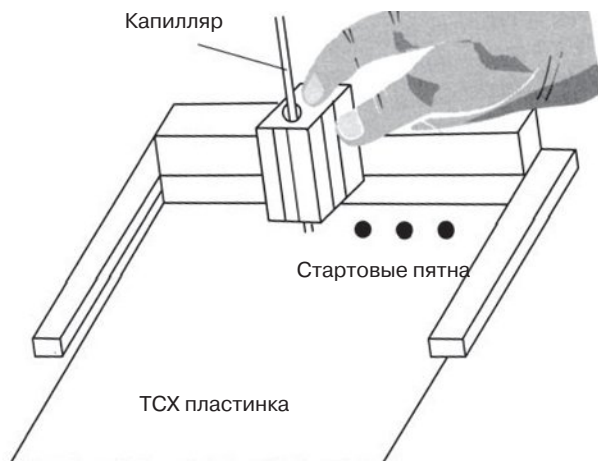


Рис. 5.5. Нанесение пробы с помощью капилляра

между 0,5 и 2 мкл. Для ВЭТСХ есть специальные капилляры, позволяющие нанести на пластинки объемы от 100 до 500 нл.

Более простые устройства управляются вручную. Давление, с которым капилляр касается слоя, при этом, однако, фиксировано и не зависит от действий пользователя. У более комфортабельных устройств при нанесении капилляр автоматически останавливается у поверхности слоя, касаясь, но не нарушая его.

При работе с капиллярами нужно следить за тем, чтобы они полностью заполнились и опорожнялись. Растворы с высокой плотностью могут вытекать частично из капилляра еще перед нанесением. Растворы с высокой вязкостью иногда могут только медленно проникать в капилляр или вытекать из него не полностью. Летучие растворители частично испаряются из капилляра перед нанесением. В этом случае предпочтительно использовать нанесение пробы с помощью шприца.

5.6.2. Системы нанесения с регулируемым объемом пробы

Капилляры обладают преимуществом простоты обращения, но имеют тот недостаток, что объем наносимой пробы у них постоянен. Устройства для нанесения переменных объемов, например, микролитровые шприцы, можно применять универсально. С такими системами можно наносить также большие объемы проб. Нанесение на следующую позицию и опускание на пластинку происходят автоматически, так же, как и циклы промывки, а скорость нанесения пробы регулируется. Механизм управления шприцем гарантирует незначительную силу нажатия и, таким образом, отсутствие повреждения слоя сорбента (рис. 5.6).

В качестве дозатора предлагается микроапликатор объемом 0,5–2,3 мкл для ТСХ и наноапликатор объемом 0,05–0,23 мкл для ВЭТСХ. Во всех устройствах используются микролитровые шприцы и дозировка происходит с помощью микрометрического винта. Применение таких устройств, однако, более сложно и требует больше времени, чем при всех других системах нанесения пробы.

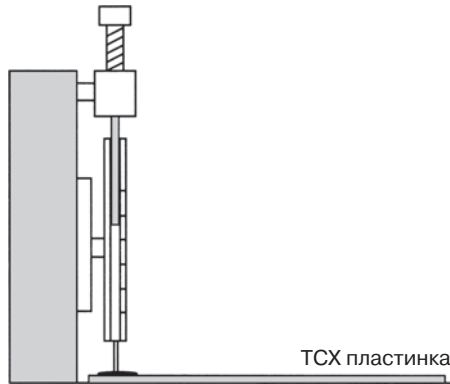


Рис. 5.6. Нанесение пробы с помощью дозирующего микрометра

5.6.3. Контактное нанесение

Для больших объемов до 100 мкл подходит процедура контактного нанесения. При этом полимерная пленка из фторированного углеводорода накладывается на углубления трафарета для нанесения пробы и вакуумируется, что обеспечивает точное прилегание пленки к углублениям. В углубления наносится раствор исследуемой пробы и затем осторожно, почти досуха, выпаривается. Сконцентрированный до небольшого объема раствор приводится в контакт со адсорбционным сло-

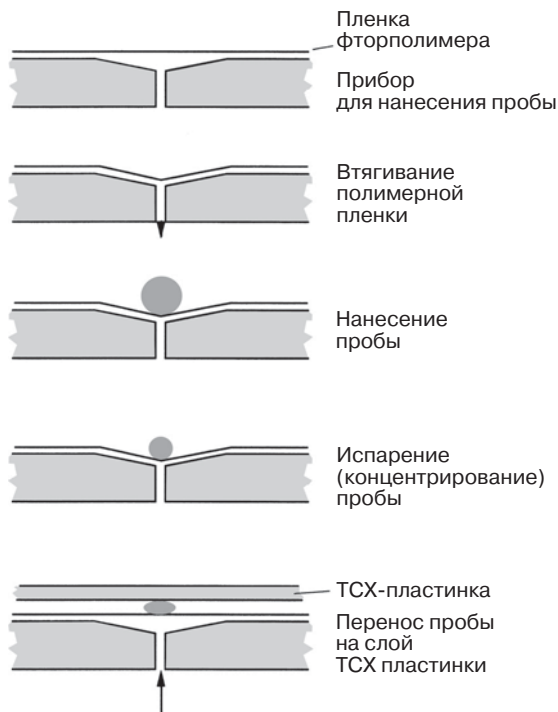


Рис. 5.7. Перенос пробы в методе контактного нанесения

ем пластинки. После этого полимерную пленку поддавливают с обратной стороны с помощью газа и пробу переносят на пластинку, как показано на рис. 5.7.

5.6.4. Автоматические устройства для нанесения пробы

Преимущество ТСХ в высокой производительности можно только тогда использовать полностью, когда будет автоматизировано нанесение проб. Примерно одна треть времени сложных анализов расходуется при нанесении пробы. Вместе с тем, этап нанесения проб не только требует больше всего времени, но и больше всего подвержен ошибкам, а также предъявляет самые высокие требования к умению и надежности лаборанта. Автоматизация этого шага делает инструментальную ТСХ более привлекательной для рутинной аналитики. Нанесение пробы с помощью автоматического устройства происходит правильно и с желательным для автоматической обработки результатов точностью дозирования пробы и ее позиционирования [5.61].

Функция автодозатора показана на рис. 5.8. В специальных закрытых емкостях находятся растворы пробы и стандартные растворы. Головная часть с капил-

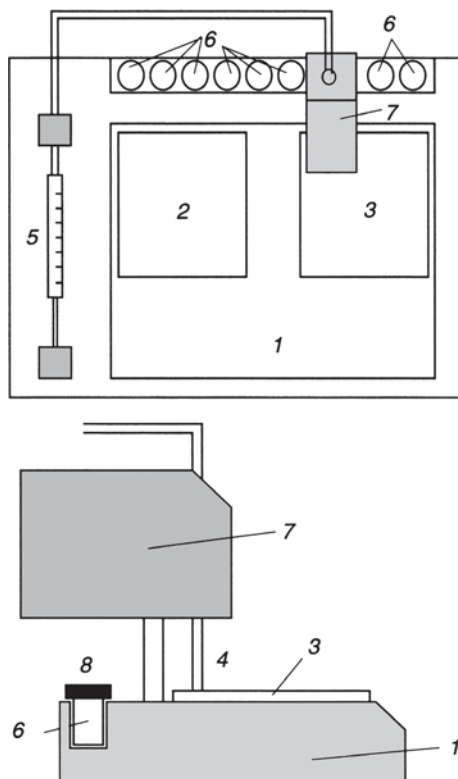


Рис. 5.8. ТСХ автодозатор: 1 — блок нанесения пробы; 2 — «черновая» ТСХ пластинка; 3 — рабочая ТСХ пластинка; 4 — капилляр для нанесения пробы; 5 — дозирующий шприц; 6 — емкости с образцами; 7 — головка устройства нанесения пробы; 8 — крышка с прокладкой

ляром, управляемая x - $у$ -позиционером, направляется к емкости пробой и забирает пробу путем протыкания резиновой прокладки. Затем капилляр подходит к предварительно выбранной позиции на пластинке ТСХ и наносит пробу. Чтобы избежать загрязнений между отдельными нанесениями проб, небольшое количество раствора пробы сначала наносится на вторую, «черновую» пластинку, чтобы освободить конец капилляра от жидкости, находящейся снаружи капилляра. После нанесения пробы капилляр направляется к сосуду для слива, в который сбрасывается оставшая часть пробы и заранее заданный объем промывной жидкости.

Вся программа полностью автоматизирована и управляется персональным компьютером. С помощью подходящих устройств, которые работают по методу распыления, возможно нанесение пробы в виде полоски. При этом пробу от иглы шприца на пластинку ТСХ переносит поток газа.

Этот давно известный принцип предотвращает повреждения слоя и делает возможным движение модуля, наносящего пробу во время подачи пробы. Таким образом, возможно бесконтактное нанесение пробы в виде штриха или в виде пятна.

5.7. Проявление хроматограммы

После того как раствор вещества нанесен на линию старта и высох, пластинку переносят в камеру разделения, которая, в большинстве случаев, наполнена элюентом на 0,5–1 см. Стартовые пятна находятся, таким образом, над поверхностью растворителя. Теперь происходит собственно получение хроматограммы. Под термином «тонкослойная хроматография» понимают процесс, в ходе которого растворитель или смесь растворителей проникает, благодаря капиллярным силам и в некоторых случаях под действием давления, в слой сорбента и движется вперед, перенося пробу. Проба разделяется на компоненты благодаря взаимодействиям с подвижной и стационарной фазами.

В процессе хроматографии происходит распределение веществ между стационарной и подвижной фазами. При этом слой сорбента и растворитель сами по себе не являются стационарной и подвижной фазами. Эти фазы возникают только после того, как пластинку поставили в камеру. Это процесс, который состоит из многих отдельных этапов. Один из них – это насыщение сорбента парами растворителя. Самый полярный компонент элюента адсорбируется на силикагеле и образует стационарную фазу вместе с уже адсорбированной во время нанесения водой из паров влажного воздуха.

На практике применяются различные, описанные ниже виды ТСХ. В принципе, есть три способа реализовать ТСХ разделение:

- линейный (восходящий или горизонтальный),
- круговой с ходом от центра (циркулярный),
- круговой с ходом к центру (антициркулярный).

В линейной ТСХ пластинку погружают ее нижним краем в подходящий растворитель, который капиллярными силами поднимается по слою и компоненты



пробы разделяются. Когда растворитель прошел нужное расстояние, хроматографию останавливают. Обычно достаточно расстояния пробега в 10 см или меньше. Пластинки непосредственно после достижения желаемого расстояния достают из камеры, растворитель быстро испаряют с пластинки струей теплого воздуха с помощью фена, так как иначе в жидкой фазе может произойти повторное смешивание разделенных веществ за счет диффузии.

Результат разделения сильно зависит от того, была ли насыщена хроматографическая камера или нет. Камеру насыщают так: часть стенок камеры с внутренней стороны обкладывают фильтровальной бумагой, наливают растворитель, закрывают камеру крышкой и оставляют примерно на 15 мин. При этом давление паров в камере обеспечивает максимальную адсорбцию вещества пробы на пластинке. При этом, например, вода, которую адсорбировал слой, может частично вытесняться. Растворитель – подвижная фаза – мигрирует вверх по этому насыщенному парами слою, который и представляет собой стационарную фазу.

При другом методе работы растворитель добавляют в пустую камеру, ставят в нее пластинку и закрывают камеру крышкой. В этом случае насыщение слоя, который находится до фронта растворителя (из которого и возникает стационарная фаза), – это сложный процесс. На фронте из-за теплоты адсорбции происходит испарение растворителя. Этот испаренный растворитель частично попадает в камеру, частично снова насыщает слой перед фронтом. Растворитель поднимается существенно медленнее, чем при насыщении камеры. Готовая хроматограмма похожа на ту, что образуется при многократном повторении разделения в насыщенной камере. Соответственно вещества мигрируют значительно дальше, чем при однократном разделении в насыщенной камере. Этот способ используют, только если при насыщении камеры вещества мигрируют очень медленно.

5.7.1. Элюент

Для качественных исследований достаточно чистоты обычно используемых в химических лабораториях растворителей; разделения для количественных оценок должны проводиться, напротив, со специальными высокоочищенными растворителями для хроматографии. Растворитель для насыщения камеры не должен использоваться слишком долго, как правило, только от 2 до 5 раз, так как компоненты смеси растворителей испаряются в зависимости от летучести при открывании камеры неравномерно. Кроме того, может происходить обеднение растворителя, если он охотно адсорбируется на пластинке. Это особенно актуально тогда, когда двухкомпонентная смесь содержит один компонент лишь в незначительном количестве. В этих случаях элюент используется однократно. В случае силикагеля это касается, например, полярных компонентов элюента. Кроме того, компоненты элюента могут взаимодействовать друг с другом.

5.7.2. Типы камер

Пластинку нужно опустить в растворитель по всей ее ширине примерно на 5 мм. При этом стартовые пятна должны лежать до уровня жидкости. Принципиально различают два вида камер, а именно: большие камеры (нормальные камеры) и

камеры с очень узким паровым пространством (камеры типа «сэндвич»). Самыми простыми являются стандартные камеры, а также двойные камеры для двух пластинок или камеры для одновременного разделения на пяти пластинках.

5.7.2.1. Нормальная камера

Чаще всего в ТСХ используется нормальная камера из стекла размерами $21 \times 21 \times 9$ см. Она подходит для одновременного разделения максимум двух пластинок 20×20 см.

В случае работы с насыщенной камерой полоску фильтровальной бумаги вырезают таким образом, чтобы осталось узкое окно для наблюдения за ходом разделения. В камеру наливают примерно от 100 до 150 мл растворителя до высоты от 0,5 до 1 см и осторожно взбалтывают, чтобы увлажнить фильтрованную бумагу и уравновесить камеру с растворителем. На крышку камеры нельзя наносить смазку, чтобы предотвратить ее попадание в растворитель или на слой сорбента.

Также нужно избегать бокового касания пластинки с фильтрованной бумаги, так как в этом случае растворитель попадает сбоку на разделяющий слой, фронт в этой области изгибается, и хроматограмма считается испорченной. По окончании разделения пластинку вынимают и сушат.

5.7.2.2. Двойная камера

Двойная камера разделена перегородкой на две части. При нормальной линейной хроматографии расход растворителя (по 20 мл на каждую пластинку 20×20 см) становится заметно меньше по сравнению с нормальной камерой, вместе с тем сокращаются и проблемы утилизации отходов. Двойная камера может использоваться также для полного предкондиционирования пластинок. При этом растворитель находится в одной части, а пластинка — в другой. Примерно через 10 мин камеру наклоняют, растворитель перемещается в другую часть камеры и начинается разделение. Как вариант камеру можно уравновесить предварительно любым растворителем, в который не погружена пластинка. Различные возможности представлены на рис. 5.9.

НОРМАЛЬНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

В процессе разделения расходуется практически весь растворитель. Это дает не только экономию растворителя, но и уменьшает проблемы удаления отходов.

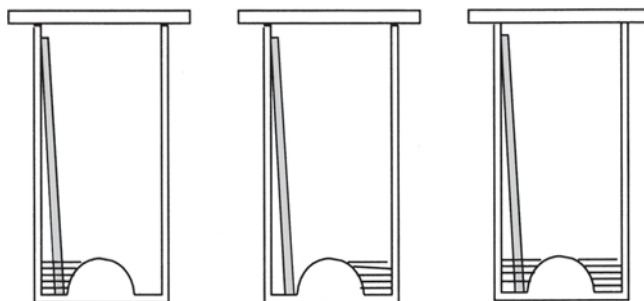


Рис. 5.9. Двойная камера

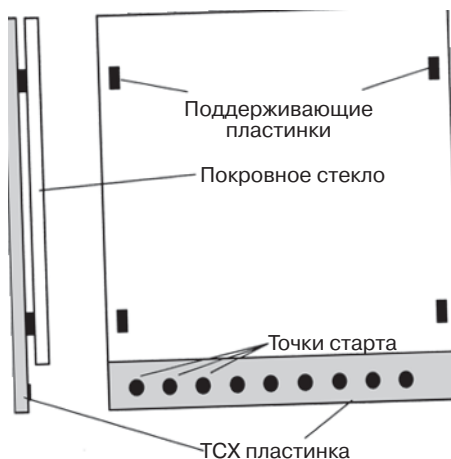


Рис. 5.10. Камера типа «сэндвич»

ПОЛНОЕ ПРЕДКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ ПАРАМИ РАСТВОРИТЕЛЯ

Растворитель находится в одной части камеры, пластинка – в другой части, через некоторое время камеру наклоняют, растворитель перемещается в другую часть камеры и начинается разделение.

НАСЫЩЕНИЕ КАМЕРЫ ВЫБРАННЫМ РАСТВОРИТЕЛЕМ

Преднасыщение может происходить сколь угодно долго. Процесс начинается только тогда, когда растворителем наполняется вторая камера, в которой стоит пластинка.

5.7.2.3. Камера типа сэндвич (S-камера)

Хроматографическая пластинка покрывается стеклянной пластиной так, что только нижняя зона шириной примерно в 2 см остается свободной. При этом стекло не должно опускаться в растворитель. Этот «сэндвич» можно устанавливать в любую камеру. Такое расположение представляет идеально ненасыщенную камеру, так как закрывающая стеклянная пластина значительно предотвращает газовый обмен с испаренным элюентом. Она может переоборудоваться, наоборот, также в идеально насыщенную камеру, когда в качестве покровного слоя используется пластинка, насыщенная растворителем.

Камера (рис. 5.10) используется, если сорбционный слой не должен быть насыщен элюентом или чтобы избежать испарения растворителя с пластинки.

5.7.3. Простая хроматография

Обычно растворителю дают подняться на 10 см над линией старта. Если же удовлетворительное разделение достигается при длине пробега растворителя, например, уже в 7 см, то это надо рассматривать как явное преимущество, так как в этом случае хроматография занимает лишь половину того времени, которое нужно для разделения при длине пробега 10 см. Если сорбционный слой насыщен раствори-

телем, то отношение времен пробега примерно пропорционально отношению квадратов длин пробега, то есть в данном случае составляет 49 : 100. Кроме того, зоны веществ из-за диффузии уширяются при увеличении времени анализа.

5.7.4. Одномерное многократное разделение

Смесь веществ можно элюировать несколько раз одним и тем же растворителем, если первое элюирование не дает достаточного разделения. Это полезно, прежде всего, для веществ с небольшой подвижностью, т.е. вещества, которые не разделяются при однократном элюировании, будут разделены при втором или третьем элюировании. Между отдельными циклами растворитель следует полностью удалять с ТСХ пластинки. Для этого пластинку сушат в токе теплого воздуха (феном). В случае чувствительных летучих веществ нужно использовать вакуумный эксикатор.

Чаще всего применяется восходящая (линейная) техника элюирования. В случае горизонтального метода элюент непрерывно подается на горизонтально расположенную пластинку с помощью фитиля или капиллярной щели, причем элюировать можно как с одной стороны пластинки, так с двух сторон к ее середине.

5.7.5. Двумерное разделение

Если компоненты смеси не разделяются полностью в одном направлении движения, то их пытаются разделить с помощью двухмерной техники. Для этого смесь веществ наносят с левого конца линии старта квадратной ТСХ пластинки. При первом элюировании получается одномерная хроматограмма. После высушивания первого элюента пластинку поворачивают на 90° налево для разделения во втором направлении. Если для обоих направлений используют один и тот же элюент, то вещества будут расположены на диагонали пластинки. Если во втором направлении используют элюент, в котором некоторые вещества имеют другую скорость миграции, то пятна вещества распределяются по поверхности пластинки, как показано на рис. 5.11. Для данной пары элюентов и данной смеси веществ

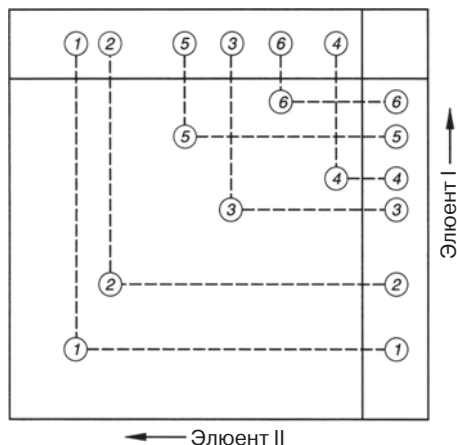


Рис. 5.11. Двумерная тонкослойная хроматография

получается характеристичное распределение. Этим методом можно разделять вещества, которые нельзя разделить при использовании только одного элюента.

5.7.6. Камера для автоматического разделения

Как правило, получение тонкослойной хроматографии требует контроля со стороны пользователя. Предкондиционирование, достижение фронтом элюента желательного пробега, извлечение и высушивание пластинки требуют высоких трудозатрат, которые не позволяют достичь высокой производительности. Благодаря автоматической ТСХ камере повышается воспроизводимость получения хроматограммы, а вместе с тем исключаются ошибки обслуживающего персонала. Пользователь освобождается от необходимости контроля. Рис. 5.12 показывает автоматическую ТСХ камеру с предкондиционированием и возможностью предварительного выбора как направления движения элюента, так и условий высушивания.

Хроматография происходит автоматически в контролируемых условиях. За движением фронта элюирования наблюдают при помощи сенсора CCD, так как мокрый слой отражает свет по-другому, чем сухой слой. Пройденное элюентом расстояние и затраченное на это время постоянно сообщаются монитором. Если элюент прошел предварительно заданное расстояние, то процесс разделения прекращается и пластинка высушивается в камере с отфильтрованным теплым или холодным воздухом. После этого она остается в этой камере под защитой до тех пор, пока пользователь не достанет ее.

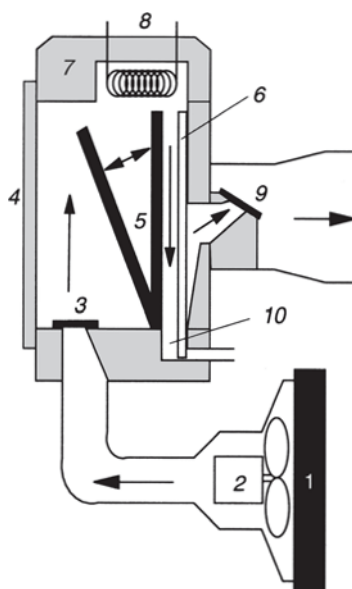


Рис. 5.12. Схематическое изображение автоматической ТСХ камеры: 1 – фильтр на основе активированного угля; 2 – вентилятор; 3 – воздушный клапан; 4 – стеклянное окошко; 5 – покровная пластинка; 6 – ТСХ пластинка; 7 – крышка камеры; 8 – нагревающий элемент; 9 – воздушный клапан; 10 – емкость с растворителем

5.7.7. Камера для линейной высокоэффективной тонкослойной хроматографии

Если высокоэффективную тонкослойную хроматограмму получают в камерах большого объема, то часто приходится мириться с недостатками, которые присущи также обычным ТСХ: неконтролируемое и изменяющееся в процессе разделения влияние газовой фазы и незаметное изменение состава подвижной фазы. В линейной камере для ВЭТСХ подвижная фаза подается в правильных, необходимых для хроматографии объемах. Разделение происходит в S-камерах либо без воздействия подвижной фазы на еще сухой слой сорбента либо с насыщением сухого слоя парами растворителя.

Разделение можно проводить с обоих краев пластинки по направлению к центру, что позволяет удваивать число проб по сравнению с обычными методами ТСХ (рис. 5.13). Несмотря на удвоенное число в распоряжении имеется достаточное пространство для разделения проб. В особых случаях, если желательна большая длина пробега, то разделение проводят только с одной стороны пластинки.

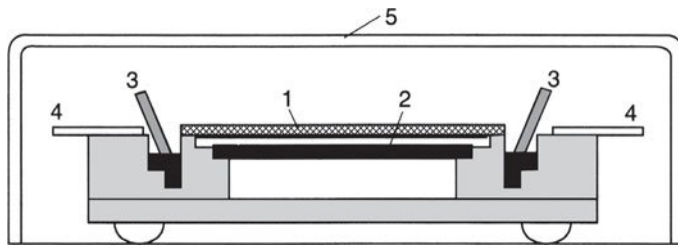


Рис. 5.13. Камера для линейной высокоэффективной тонкослойной хроматографии

Пластинку для ВЭТСХ (1) кладут слоем вниз на линейную камеру. На небольшом расстоянии не более 0,5 мм помещают стеклянную пластинку (2). Таким образом, предотвращают влияние паров подвижной фазы на сухой слой. Если разделению благоприятствует предкондиционирование слоя или предварительное насыщение камеры парами подвижной фазы, то перед разделением пластинку уравнивают с растворителем в специальном сосуде.

Подвижную фазу подают шприцом от 1 до 1,5 мл в каждую из двух ванн. Процесс разделения начинается при опрокидывании в ванны по направлению к пластинке двух стеклянных полосок (3). Одновременно с этим ванны с подвижной фазой закрываются маленькими защитными крышками (4). Между стеклянной полоской (3) и стенкой ванны образуется капиллярная щель, по которой подвижная фаза мгновенно поднимается и подается равномерно к краю слоя. Чтобы исключить внешнее влияние во время разделения, камеру закрывают защитным колпаком (5).

Это метод разделения в горизонтальной камере принят ВОЗ для контроля лекарственных растений, а также вошел в немецкий лекарственный кодекс и в Европейскую рецептурную книгу.

5.7.8. Инструментальное многократное разделение

В случае реальных проб речь идет в основном о сложных смесях проб, компоненты которых могут сильно отличаться своей полярностью. Поэтому преобладающее число разделений ВЭЖХ проводится с помощью градиентного элюирования, при котором во время разделения изменяется полярность подвижной фазы. Поэтому для тонкослойной хроматографии также было необходимо разработать автоматизированный прибор для градиентного элюирования. При этом основная идея состоит в том, что хроматографическое разделение расчлениют на несколько этапов, причем после каждого отдельного этапа подвижную фазу полностью удаляют с пластинки. Тем самым реализуется второе преимущество этого метода, которое состоит в том, что зоны веществ будут сфокусированы.

В 1973 году была предложена новая техника разделения для ТСХ [5.7], названная программируемым многократным элюированием, ПМЭ (англ.: Programmed multiple development, PMD). В данном методе пластинка неоднократно обрабатывается одной и той же подвижной фазой в одном и том же направлении. Длина пробега веществ несколько увеличивается на каждом следующем этапе по сравнению с предыдущим. Между разделениями слой просушивают с помощью теплового излучения, которое может сопровождаться потоком воздуха (фен). Нижний край слоя остается постоянно погруженным в подвижную фазу, причем резервуар для подвижной фазы изолирован от теплового воздействия. Длина пробега подвижной фазы на каждом этапе регулируется по времени, т.е. продолжительностью интервалов между циклами высушивания.

Более новым методом является предложенное в 1984 году «автоматизированное многократное элюирование», АМЭ (Automatted multiple development, AMD), которое делает возможным воспроизводимое градиентное разделение с помощью инструментальной ТСХ и, в принципе, является дальнейшим совершенствованием метода ПМЭ [5.8]. Техника АМЭ следует тому же принципу получения хроматограмм в несколько этапов в одном и том же направлении, причем каждое отдельное разделение происходит при большей длине пробега подвижной фазы, чем на предшествующем этапе. Различие с ПМЭ состоит в том, что для каждого этапа можно использовать другую подвижную фазу. Для этого подвижная фаза после каждого прогона полностью удаляется из камеры. Чтобы избежать возникновения артефактов при сушке пластинки, высушивание проводят при пониженном давлении.

Для разделения веществ, обладающих широким диапазоном полярностей, так же, как для разделения веществ с неизвестным хроматографическим поведением, подходит универсальный градиент. Иначе, чем в колоночной хроматографии, для силикагеля в качестве стационарной фазы градиент начинается с наиболее полярного растворителя с наименьшей длиной пробега и заканчивается наименее полярным растворителем, который проходит наибольшее расстояние. Рис. 5.14 показывает типичный градиент элюента, который формируется тремя растворителями: метанолом, дихлорметаном и н-гексаном. Такой градиент дополнительно может содержать диэтиловый эфир и/или ацетонитрил, если окажется, что разделение происходит в полярной области. Длительность разделения возрастает

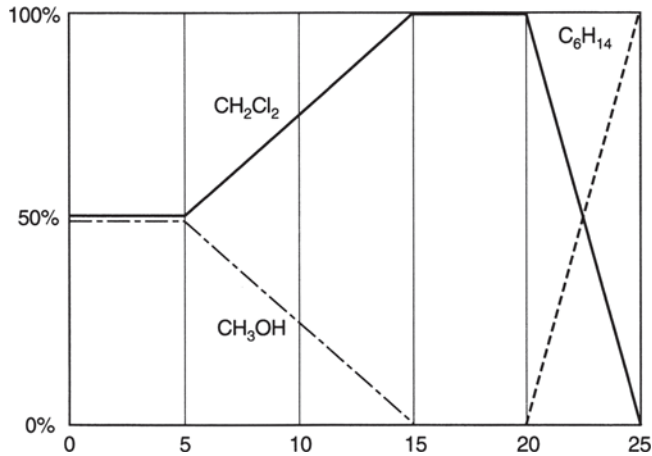


Рис. 5.14. Типичный универсальный градиент

от этапа к этапу. Временные интервалы выбирают таким образом, что длина хроматографического пути возрастает на каждом этапе примерно на 3 мм.

Уже в методе ПМЭ, который использует одну и ту же подвижную фазу на всех этапах, у разделенных фракций была тенденция концентрироваться в виде тонких полос (зон). Это происходит потому, что восходящей фронт подвижной фазы сначала контактирует с «нижней» частью зоны разделения и вызывает ее движение в направлении разделения — и это происходит каждый раз, когда фронт растворителя проходит зону разделения. Этот механизм показан на рис. 5.15. Эффект концентрирования усиливается еще больше в методе АМЭ, где подвижная фаза, которая первой проходила зону разделяемых вещества, является самой полярной и оказывает, таким образом, самое сильное элюирующее действие на все компоненты. Первые пять ступеней разделения осуществляются смесью метанол — дихлорметан 50 : 50, затем десять ступеней, в которых содержание метанола постепенно сокращается до нуля и т.д.

Таким образом, техника АМЭ является фокусирующей. Сначала восходящая подвижная фаза контактирует с нижней частью зоны веществ и вызывает его миг-

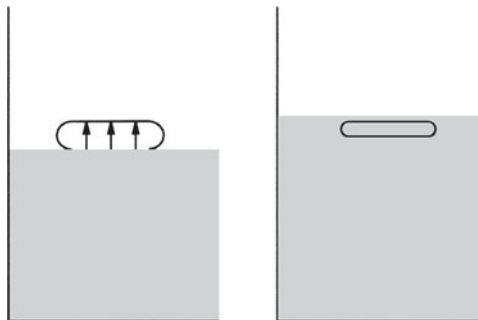


Рис. 5.15. Эффект концентрирования при прохождении каждого фронта растворителя

рацию в направлении разделения, вследствие чего фракция фокусируется в виде тонкой полоски.

Комбинация фокусирующих эффектов и градиентного разделения позволяет добиться наиболее узких хроматографических зон, ширина пиков которых не зависит от пути миграции. Типичное значение полуширины составляет 1 мм, так что на отрезке длиной 80 мм могут полностью разделяться до 40 компонентов (разделение до базовой линии). Инструментальная ТСХ, объединенная с автоматическим многократным элюированием и градиентом полярности элюента, отличается чрезвычайно высокой аналитической разрешающей способностью.

Затраты на воспроизводимое многократное элюирование оправданы только при использовании соответствующего автоматического устройства. Все параметры, которые влияют на хроматографическое разделение, системой управляются или поддерживаются постоянными автоматически. До сих пор этот метод является единственным, который обеспечивает воспроизводимое градиентное разделение ТСХ [5.9]. С помощью универсального градиента с первого раза могут разделяться вещества с очень различной полярностью. Это делает данный метод особенно интересным для экологического анализа, где нужно обрабатывать очень сложные смеси веществ [5.10]. Однако в зависимости от выбора градиента полный анализ может занимать при этом до нескольких часов.

Принцип работы устройства для автоматического многократного разделения представлен на рис. 5.16. Центральный модуль состоит из собственно камеры для разделения (1) с входами и выходами для подвижной фазы и для газовой фазы. Градиент подвижной фазы формируется с помощью градиентного смесителя (4) из отдельных компонентов, которые находятся в отдельных емкостях (2). Смеситель связан с емкостями для растворителей через кран, снабженный для переключе-

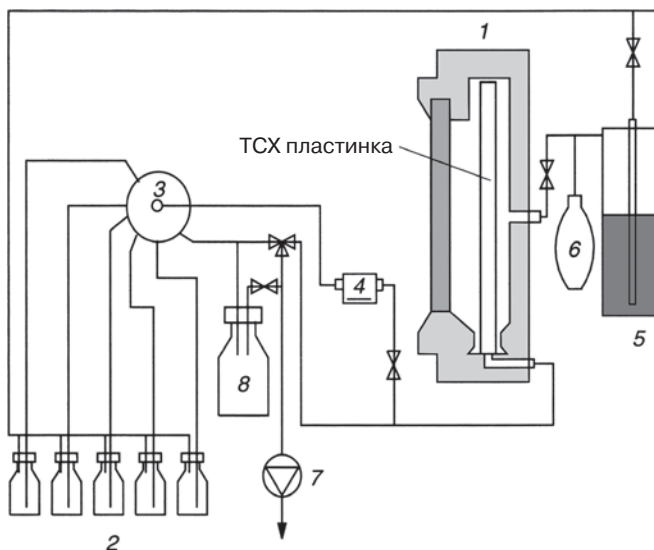


Рис. 5.16. Модуль для проведения автоматического градиентного элюирования в ТСХ (метод АМЭ)

чения мотором (3). Кондиционирование газовой фазы осуществляется пропуском азота через промывную бутылку (5), который затем поступает в газосборник кондиционированного газа (6). Оттуда газовая фаза направляется в камеру для разделения. Система управляется микропроцессором, который можно свободно программировать.

Элюент из смесителя направляется в камеру, в которой находится пластинка для ВЭТСХ. Геометрия устройства для подачи элюента такова, что процесс хроматографии начинается мгновенно и равномерно по всей ширине пластинки. По окончании заданного времени разделения, которое определяет длину пробега, подвижная фаза удаляется из камеры: сначала через сливные емкости (8), в которых собираются остатки растворителей; затем, когда вся жидкость из камеры удаляется, эвакуируется с помощью масляного насоса (7) и, таким образом, слой сорбента высушивается.

Перед началом следующего этапа разделения слой предкондиционируется газовой фазой из газосборника (6). Во время высушивания в смесителе (4) идет приготовление подвижной фазы для следующего этапа.

Полная программа состоит из 25 этапов, т.е. 25-разовое разделение с увеличением пути пробега и промежуточными высушиваниями длится примерно 4 час. Уменьшение числа ступеней до 20 сокращает общее время разделения уже на 2,5 час. Так как вся программа, включая конечное высушивание хроматограммы, полностью автоматизирована и пластинка в атмосфере азота, то такое разделение может проводиться в отсутствие персонала лаборатории [5.11].

5.7.9. Планарная хроматография

Планарная хроматография является, собственно говоря, наиболее простым и самым старым из известных методов и уже очень давно применяется с большим успехом (рис. 5.17). С развитием тонкослойной хроматографии она была предана забвению, пока, наконец, ее не открыли заново в ВЭТСХ и одновременно не предложили прибор, контролирующий проведение разделений этим методом.

Слой сорбента в планарной хроматографии расположен горизонтально. Вещества наносятся кольцеобразно вокруг центра тонкослойной пластинки, подвижная фаза подается в центр этих колец. Компоненты мигрируют с подвижной

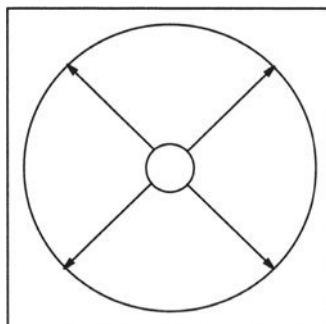


Рис. 5.17. Принцип планарной (круговой) хроматографии



фазой на периферию пластинки в форме концентрических круговых сегментов и при этом разделяются. В сравнении с линейной хроматографией этим методом можно особенно хорошо разделять сильноудерживаемые вещества, которые мало перемещаются при движении подвижной фазой [5.12].

5.7.9.1. Принцип U-камеры

Подачу подвижной фазы в центр тонкослойной пластинки осуществить сложнее, чем ее подачу при линейном разделении и поэтому требуется особая хроматографическая камера (рис. 5.18). Пластика для ВЭТСХ (1) лежит слоем вниз в держателе U-образной камеры (2). Подвижная фаза подается из центрального капилляра (3). Само дозирование подвижной фазы происходит с помощью присоединенного шприца объемом 250, 500 или 1000 мкл, который приводится в действие шаговым двигателем. Скорость потока и объем подвижной фазы выбирают заранее и регулируют электронным устройством.

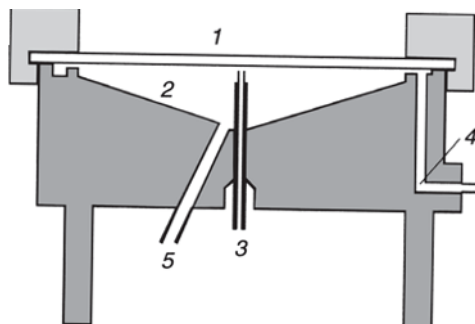


Рис. 5.18. Круговая хроматография в системе с U-образной камерой

Насыщение камеры в этом методе происходит таким образом, что газовая фаза, которую готовят снаружи в промывной бутылки, направляют в камеру через кольцевую щель (4) на наружном крае слоя и снова удаляют через центральное отверстие (5). Нанесение пробы на сухой слой происходит вне U-образной камеры. Чтобы центр кольца, на котором находятся исходные точки, точно совпадал с точкой ввода подвижной фазы, пластинку при нанесении пробы фиксируют в кольцевом держателе. Фракции при разделении проявляются в виде концентрических колец.

5.7.9.2. Особенности кругового разделения

Разделения особенно сильно удерживаемых веществ, то есть в области низких R_f , в планарной хроматографии проявляются намного более отчетливо, чем при линейной хроматографии с тем же адсорбентом и той же самой подвижной фазой. Это связано с относительным увеличением величины R_f согласно выражению:

$$R_{f\text{линейный}} = (R_{f\text{круговой}})^2.$$

Перегрузки пробы (например, по одному или нескольким компонентам) нивелируются практически без потери в качестве разделения, так как перегрузка вызывает диффузионное уширение хроматографических зон в периферийном направлении, но не в радиальном направлении (разделения).

Подвижная фаза попадает из закрытой системы непосредственно на слой. Подаваемая подвижная фаза имеет, таким образом, во время всего процесса разделения постоянный состав, что улучшает воспроизводимость. Недостатком является то, что с ростом величины R_f образуются все более вытянутые пятна, которые поддаются только лишь условно количественной обработке.

Система с U-камерой представляет собой методически правильный предварительный эксперимент для переноса результатов разделения ТСХ на ВЭЖХ (мокрое нанесение).

5.7.9.3. Принцип мокрого нанесения

В ВЭЖХ стационарная и подвижная фазы в процессе подачи пробы находятся в равновесии. Хроматография происходит в этих равновесных условиях, т.е. в изократическом режиме. В обычной тонкослойной хроматографии проба наносится на стационарную фазу до того, как она входит в контакт с подвижной фазой. Поэтому хроматографическое разделение проходит одновременно с постепенным установлением равновесия между стационарной и подвижной фазами. Это существенная причина, по которой результаты, полученные в ТСХ, нельзя непосредственно переносить на ВЭЖХ.

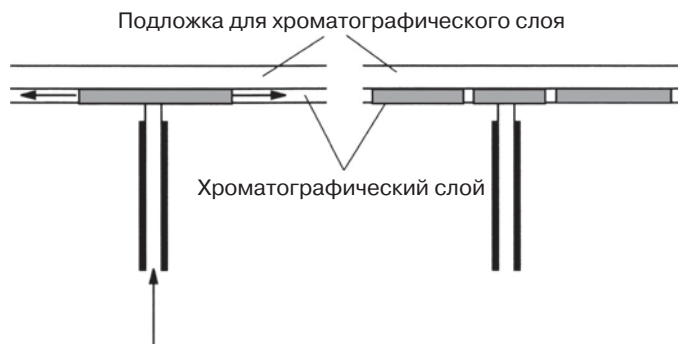


Рис. 5.19. Принцип влажного нанесения пробы

Только в системе с U-камерой с принудительной подачей подвижной фазы можно правильно моделировать условия колоночной хроматографии, причем используется принцип мокрого нанесения пробы (рис. 5.19). При этом подвижная фаза подается на слой сорбента до тех пор, пока не установится равновесие между стационарной и подвижной фазами. Только тогда через центральный капилляр вводится проба. Хроматографическое разделение теперь проходит, как в колонке. Лишняя подвижная фаза удаляется через наружный край пластины.

5.7.10. Антикруговое элюирование

Антикруговое элюирование представляет вариант разделения, обратный круговой хроматографии. Подвижная фаза подается здесь на периферию круга и мигрирует к его центру (рис. 5.20). Стартовые точки пробы расположены кольцеобразно по внешнему краю пластинки. По сравнению с линейным элюированием этим методом особенно хорошо разделяются вещества с большей величиной R_f .

Подвижная фаза подается на слой сорбента по окружности с радиусом 45 мм, откуда она движется в центр пластинки (рис. 5.21). До этого наносят пробы вдоль внутренней стороны этого круга. Количественная оценка при этом становится проще и точнее, так как при радиальном сканировании измерительной щелью все фракции охватываются полностью. Наблюдаемая при круговой хроматографии поперечная диффузия фракций с высокой концентрацией здесь полностью подавляется.

Пластинка для ВЭТСХ, закрепленная в кольцевом держателе, устанавливается затем на очень небольшом расстоянии над камерой. Для насыщения камеры газовой фазу можно подавать через центр на слой сорбента. Опускание пластинки непосредственно на камеру вызывает мгновенное поступление подвижной фазы из уже ранее наполненного кольцевого канала на слой сорбента. Подвижная фаза подается на слой за счет капиллярных сил. Ближе к наружному краю слой сорбента прерывается круговой выемкой.

Антикруговой метод – наиболее быстрый из всех возможных видов элюирования для данной подвижной фазы. Вследствие сочетания геометрии пластинки

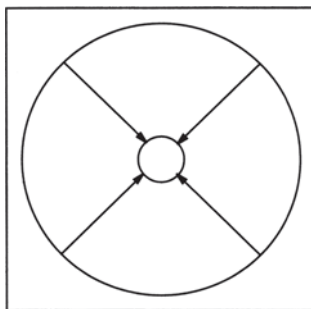


Рис. 5.20. Принцип антикругового элюирования

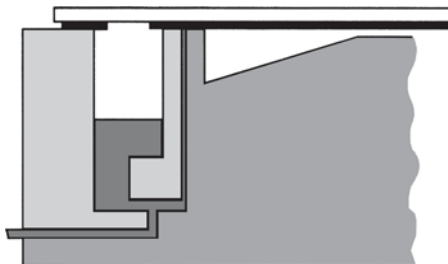


Рис. 5.21. Устройство камеры для антикруговой тонкослойной хроматографии

и закона течения скорость движения подвижной фазы, направленной к центру, остается постоянной. Антикруговое элюирование — это единственный метод, который дает возможность использовать область высоких R_f . Хотя от антикругового метода не стоит ждать лучших результатов разделений, чем от линейного или даже кругового, он действительно интересен для рутинных анализов, в том числе из-за отсутствия проблем при определении положения проб и обработке сигнала.

5.7.11. Методы с принудительным потоком

В то время как при проведении АМЭ, которое может длиться в зависимости от выбора градиента до нескольких часов, подъем подвижной фазы в стационарной фазе вызывают капиллярные силы, время разделения заметно сокращается в методах с принудительным потоком благодаря тому, что дополнительно создается внешний поток подвижной фазы. Так при элюировании с помощью центрифуги, а также при планарной хроматографии с циркулярным вращением транспорта подвижной фазы поддерживают направленные от центра радиальные движущие силы. С принудительным потоком даже при микропрепаративных разделениях природных веществ удается достичь замечательных результатов.

При планарной жидкостной хроматографии высокого давления (ПЖХВД) речь также идет о круговой или антикруговой технике разделения. Эта жидкостная хроматография в тонком слое под высоким давлением позволяет одновременно хроматографически разделять до 24 проб за 2 мин, причем разделение происходит, например, при давлении 80 бар. Потребление подвижной фазы в высшей степени незначительно и составляет 1 мл для разделения от 1 до 24 проб.

ПЖХВД функционирует следующим образом: стандартная пластинка для ВЭТСХ (100 × 100 мм) из стекла образует со второй стеклянной пластинкой, выравнивающей давление пористой промежуточной пластинкой, и двумя стальными зажимами «хроматографический сэндвич», как показано на рис. 5.22. Пробу можно дозировать внешним и внутренним способом. При внешнем вводе пробы необходим нанодозатор и автомат для ввода проб. Внутреннее дозирование происходит с помощью шестиходового крана, как в ВЭЖХ. При этом пробу вместе с подвижной фазой подают в центр пластины.

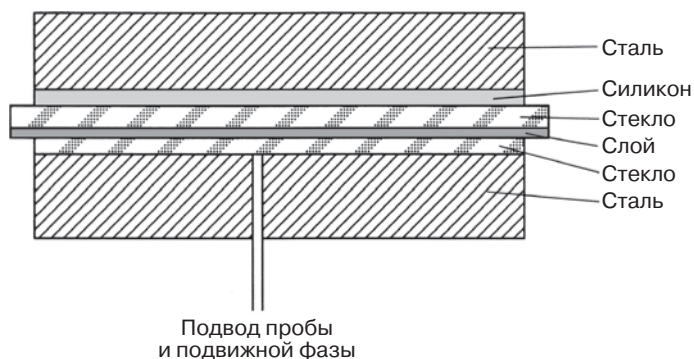


Рис. 5.22. Устройство камеры типа «сэндвич» для ПЖХВД

Подача подвижной фазы происходит с заданным давлением и в заданном количестве. Шаговый двигатель приводит в движение соединенный с прецизионным резьбовым механизмом поршень герметичного шприца объемом от 1 до 1000 мкл. Поток может изменяться от 1 до 2000 мкл в минуту. «Хроматографический сэндвич» прочно стягивается с помощью пневматического кривошипно-коленного пресса.

5.8. Обработка тонкослойной хроматограммы

После элюирования тонкослойные пластинки достают из камеры и сразу сушат, чтобы предотвратить дальнейшую диффузию пятен веществ. При этом хроматограмма как будто «замерзает», и разделенные вещества идентифицируются на пластинке. Проще всего это удастся для цветных соединений, которые непосредственно видны на пластинке. Для бесцветных веществ необходимы особые методы обнаружения. Чтобы визуализировать разделенные вещества на пластинке, в первое время в ТСХ почти всегда применялись опрыскивающие реагенты. Они образуют с пятнами веществ на слое сорбента окрашенные комплексы.

Многие вещества становятся видны благодаря поглощению или флуоресценции, если тонкослойную пластинку рассматривают под коротковолновой или длинноволновой ультрафиолетовой лампой. При современной непосредственной количественной оценке ТСХ вполне возможна работа в ультрафиолетовом диапазоне спектра. Таким образом, от окрашивания, т.е. химической дериватизации, можно, в общем, отказаться.

Для оценки ТСХ в распоряжении есть множество методов, которые приспособлены к различным задачам. По сравнению с колоночной хроматографией пре-

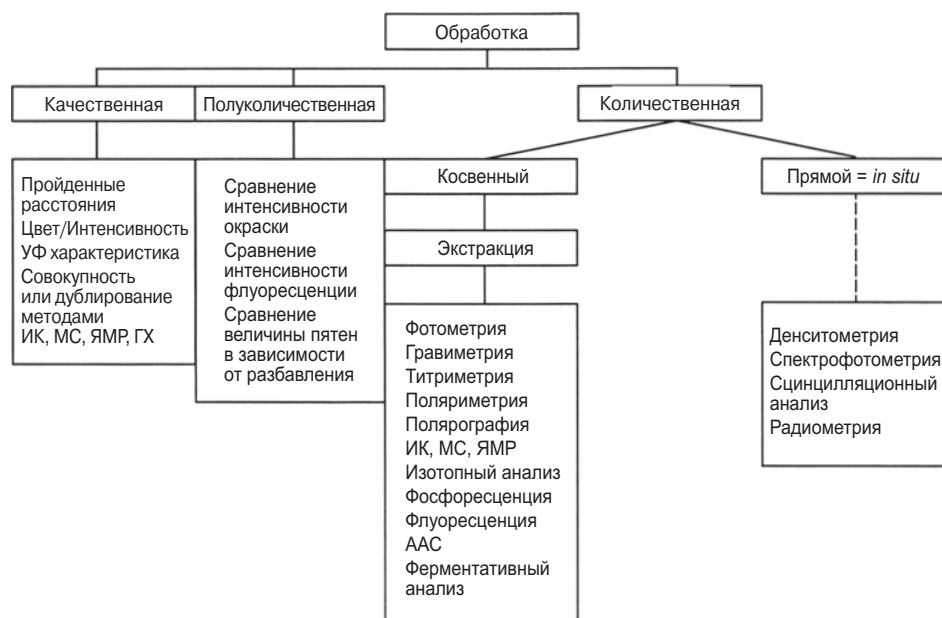


Рис. 5.23. Методы обработки результатов ТСХ

имущество ТСХ состоит в том, что разделенные вещества остаются без какого-либо растворителя на высушенном слое. Влияние элюентов больше не нужно учитывать при дальнейшей обработке. Рис. 5.23 показывает обзор многочисленных видов обработки хроматограммы.

5.8.1. УФ детектирование

УФ детектирование — это быстрый и простой способ обнаружения разделенных соединений. В продаже имеются ультрафиолетовые лампы с длинами волн излучения 254 нм и/или 366 нм. Обнаружение можно проводить в затемненных помещениях или в камерах со встроенной ультрафиолетовой лампой.

Вещества, которые поглощают, например, ультрафиолетовое облучение при 254 нм, могут быть обнаружены очень просто в слоях с индикатором флуоресценции с длиной волны возбуждения 254 нм и зеленой флуоресценцией. Они уменьшают эмиссию возбужденного индикатора флуоресценции именно при 254 нм и проявляются, поэтому как темные (темно-фиолетовые) зоны на флуоресцирующей основе (уменьшение флуоресценции или тушение флуоресценции).

Вещества, которые возбуждаются ультрафиолетом до собственной флуоресценции, обнаруживаются на пластинках преимущественно без индикатора флуоресценции. При облучении ультрафиолетом они становятся видны на темном фоне как светящиеся окрашенные флуоресцирующие зоны. Оба метода обычно не изменяют и не разрушают химической структуры определяемого соединения и поэтому лучше всего подходят также для препаративных целей.

5.8.2. Детектирование с помощью дериватизации

Очень многие соединения бесцветны, недостаточно поглощают в ультрафиолетовом спектре и не флуоресцируют. Реакции дериватизации используются тогда, когда отдельные разделенные фракции нельзя обнаружить с помощью ультрафиолетового облучения или чувствительность их обнаружения недостаточна. В принципе это не имеет значения, применяется реагент для дериватизации перед нанесением вещества (предхроматографическая дериватизация) или после элюции (постхроматографическая дериватизация).

Предхроматографическая дериватизация служит в первую очередь для визуализации, а кроме того, чтобы повысить избирательность разделения исследуемых соединений или чтобы перевести неустойчивые соединения в стабильные. Постхроматографическая дериватизация служит, прежде всего, для визуализации разделенных веществ или для повышения чувствительности обнаружения. С помощью особых реактивов, которые в большинстве случаев наносят на слой распылением, разделенные вещества становятся видимыми. Некоторые из этих реактивов доступны в готовой к употреблению форме растворов. Все же большинство из них нужно готовить в лаборатории и наносить с помощью подходящих распылителей. Несколько наиболее распространенных реагентов для обнаружения различных классов соединений приведены в табл. 5.2.

Опрыскивание не должно смывать пятна веществ. Разбрызгивание всегда следует проводить в вытяжном шкафу с хорошей тягой или подходящим устройством

Таблица 5.2. Сопоставление проявляющих реагентов

Проявляющий реагент	Качественная реакция
Нингидрин	Аминокислоты и производные, пептиды, белки, ароматические амины
Пары йода	Ненасыщенные соединения, соединения, богатые водородом
Родамин Б	Липиды, стероиды, эфиры, а также углеводороды
Молибдатодифосфорная кислота	Многие соединения, служащие восстановителями, как, например, вещества с гидроксильными группами
Диметиламинобензальдегид	Первичные аминогруппы
Бромкрезоловый зеленый	Кислоты

для удаления в большинстве случаев ядовитых или агрессивных дисперсий реагентов и паров растворителя. Только когда образовался равномерный аэрозоль, распылитель направляют на пластинку и обрызгивают ее равномерно, как правило, вплоть до того момента, когда слой начнет становиться прозрачным. Избыточное опрыскивание проявителем может вызывать растворение или смывание некоторых соединений со стоящей под наклоном пластинки.

Наряду с устройствами для распыления доступны также устройства для обработки пластин методом погружения. Вертикальное погружение и извлечение, а также обработка в течение нескольких секунд в камере погружения доступны и автоматизированы. При погружении существует опасность того, что растворитель смывает соединения или вода из проявителя смывает слой сорбента. Однако в процессе погружения проявляющий реагент распределяется более равномерно, чем при опрыскивании.

Некоторые реагенты могут подмешиваться в адсорбционный слой, причем собственно дериватизация иногда происходит только после нагревания. Некоторые реактивы можно подавать также с газовой фазой или подмешивать в подвижную фазу. Часто после обработки реагентами-проявителями хроматограммы нужно нагревать в сушильном шкафу или на электроплитке, чтобы ускорить реакцию. Неорганические слои устойчивы также к очень агрессивным реагентам, как, например, концентрированной серной кислоте, и к обработке органических веществ последующим нагреванием до высоких температур.

Очень многие органические соединения могут проявляться в виде коричневых пятен в парах йода или при опрыскивании раствором йода. Смесь из марганцовокислого калия и серной кислоты – это универсальный реагент, который можно применять для обнаружения различных углеводов. Пятна вещества появляются в виде белых зон на розовом фоне.

5.8.3. Качественный анализ

На готовой хроматограмме пятна обводят острым карандашом сплошной или пунктирной линией и отмечают центр пятна. Качественную обработку ТСХ делают для того, чтобы идентифицировать вещества в смеси, а также для проверки чистоты или для разделения смесей. Это особенно полезно при контроле синтеза или хода реакции.



Рис. 5.24. Схема, поясняющая определение Rf-значений

Для этого используют либо нанесение стандартов или веществ сравнения, или разделенные вещества характеризуют так называемыми величинами Rf. Это обозначение происходит от английского Rf = Ratio of fronts (отношение к фронту растворителя). Величина Rf рассчитывается как частное от деления измеренных на хроматограмме путей пробега (рис. 5.24).

$$Rf = \frac{\text{Расстояние от линии старта до пятна вещества}}{\text{Расстояние от линии старта до фронта подвижной фазы}}.$$

Из-за многочисленных плохо контролируемых факторов, влияющих на движение веществ, Rf нужно рассматривать только как контрольную величину. Вещество, имеющее одинаковую длину пробега в идентичных условиях, можно применять в качестве стандарта для оценки реальной величины R, обозначаемой как R_x- или R_{st}-стоимость:

$$R_{st} = \frac{\text{Расстояние от линии старта до пятна вещества}}{\text{Расстояние от линии старта до пятна вещества сравнения}}.$$

В отличие от величины Rf, которая меньше или равна 1, величина R_{st} может быть также больше 1. Для идентификации необходимо сопоставить Rf исследованных соединений и Rf веществ сравнения. Если они совпадают, то вероятно (однако не гарантировано), что речь идет о тех же самых веществах. Достоверная идентификация возможна только тогда, если наряду с тонкослойной хроматографией проводятся спектроскопические исследования (например, ИК спектроскопия, ЯМР спектроскопия, масс-спектрометрия или их комбинации с ТСХ).

5.8.4. Разделяющая способность метода ТСХ

Разделяющую способность ТСХ системы можно узнать по уширению зоны, которое претерпевает нанесенное пятно вещества в процессе хроматографического разделения. Также и в ТСХ можно рассчитать число теоретических тарелок N :

$$N = 16 (X/W)^2.$$

При этом X обозначает расстояние, проеденное пятном вещества от линии старта, и W – диаметр пятна. Для ВЭТСХ пластинок на расстояние 10 см N достигает величины 5000. При качественном сравнении величин N это соответствует наполненной колонке для ГХ длиной 2 м; ВЭЖХ колонка длиной 25 см и внутренним диаметром 4,6 мм достигает от 10 000 до 15 000 теоретических тарелок.

Более наглядным является сравнение высот теоретических тарелок: типичная величина – от 6 до 10 мкм для колонки ВЭЖХ, 12 мкм для ВЭТСХ пластинки. Чем меньше высота теоретической тарелки, тем большее число раз происходит разделение на пути пробега и тем выше разделяющая способность.

Нужно различать эффективность и селективность разделения. В то время как уширение пиков сказывается на эффективности разделения, селективность указывает на степень различия величин R_f разделенных веществ. Рис. 5.25 поясняет эту связь.

Левая хроматограмма показывает узкие пики и, таким образом, высокую эффективность разделения. Однако селективность разделения плохая, так как вещества разделены неполностью. На правой хроматограмме показана плохая эффективность разделения, поскольку получены широкие пики, но хорошая селективность. Величины R_f в этом случае отчетливо различны.

Для практического приложения, прежде всего, важно, насколько хорошо в данной ТСХ системе (подвижная и стационарная фазы) разделяются два разных

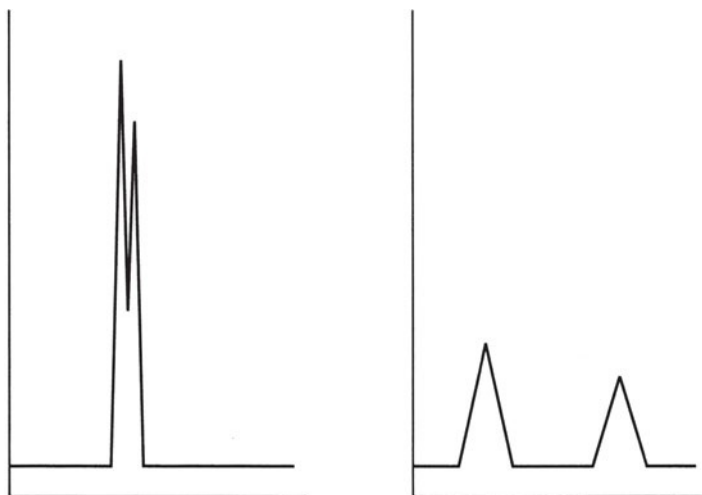


Рис. 5.25. Различие между эффективностью и селективностью разделения

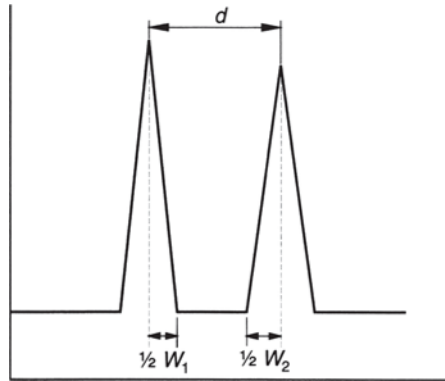


Рис. 5.26. Определение хроматографического разрешения

вещества. Это зависит как от эффективности, так и от селективности разделяющей системы. Характеризующий ее параметр – это разрешение R_s :

$$R_s = d / (1/2 W_1 + 1/2 W_2).$$

Здесь величины W обозначают диаметры пятен двух веществ 1 и 2, d – расстояние между центрами пятен. Это значит, что чем больше расстояние W и чем меньше средний диаметр пятен веществ, тем лучше разрешение. Если $1/2 W_1 + 1/2 W_2 = d$, то $R_s = 1$, и вещества будут разделены до базовой линии, т.е. хроматографический сигнал между пиками достигает базовой линии. На рис. 5.26 схематически показано, как рассчитывают хроматографическое разрешение.

5.8.5. Количественный анализ

Количественные измерения или оценки при разделениях с помощью колоночной хроматографии выполнимы с более высокой точностью благодаря широким возможностям используемых детекторов, как, например, проточного УФ спектрофотометра. Поиски простого метода количественного определения разделенных веществ в тонкослойной хроматографии интенсивно ведутся с момента ее открытия. При этом были предложены различные подходы, которые с различным успехом используются и до сегодняшнего дня:

- визуальное сравнение ареалов пятен или их замер или подсчет,
- экстракция и определение веществ другими методами,
- спектроскопические методы измерения на пластинке.

5.8.5.1. Визуальное сравнение

Простой полуколичественный метод определения состоит в измерении площади пятен, так как она зависит от нанесенного количества вещества. В широкой области концентраций выполняется линейное соотношение квадратного корня из площади пятна F и логарифма количества нанесенного вещества M :

$$\sqrt{F} = a \log M + b.$$



a и b являются индивидуальными константами. Визуальное сравнение ареалов пятен, которое широко использовалось в бумажной хроматографии, в тонкослойной хроматографии позволяет получить ориентировочные полуколичественные оценки. Напротив, приемлемые результаты можно получить после перенесения ареалов пятен на миллиметровую бумагу и вычисления величины пятна. Так как на абсолютную площадь пятна влияют толщина и активность хроматографического слоя, то лучшие результаты можно получить, если известное количество вещества хроматографируют совместно с пробой и сравнивают относительные величины пятен в пределах одной хроматограммы. Этим методом получают результаты с ошибкой примерно 10%.

В тонкослойной хроматографии для визуализации разделенных веществ в первую очередь используют ультрафиолетовый свет. Если вещества не видны в УФ или для их обнаружения необходимы специфические реакции, то необходимые реактивы должны распределяться по пластинке по возможности более равномерно. Если провести реакцию в газовой фазе (например, брома, йода) или погружением невозможно, то реагенты наносят опрыскиванием пластинки.

5.8.5.2. Экстракция

Самые точные результаты получают, если анализируемое соединение извлекают с тонкослойной пластинки. Это происходит либо соскабливанием зоны вещества шпателем и последующей экстракцией вещества растворителем, либо элюированием соединения непосредственно с пластинки. Экстракция отдельных разделенных веществ применялась и раньше, например, в микропрепаративных целях, так как она открывает возможность дальнейшего аналитического исследования очищенных веществ. Последний метод отличается высокой воспроизводимостью результатов, минимальным разбавлением пробы и рациональным способом работы, который отчасти даже поддается автоматизации. Разделенные ТСХ зоны могут, таким образом, выделяться препаративно.

При поиске положения пятен вещества на пластинке опрыскивание реактивами, в общем случае, не рассматривается, так как это приведет к изменению веществ. Таким образом, нужно использовать значения R_f , полученные в отдельно проведенном разделении и проявленном с использованием проявляющих реагентов. Конечно, проще найти на пластинке окрашенные или УФ поглощающие вещества.

Для элюирования пятна вещества с тонкослойной пластинки применяется специальная элюирующая головка, которая представлена на рис. 5.27. После деления вокруг элюируемой зоны процарапывается кольцевая граница. Головка элюатора опускается на хроматографическую зону и плотно прижимается. После задания условий элюирования включается автоматическое элюирование. Растворитель медленно прокачивается через ограниченную зону слоя сорбента, входя с левой и выходя с правой стороны, и улавливается в специальную емкость. Из собранного раствора после испарения растворителя выделяют чистое соединение и отправляют его затем на дальнейший анализ, например, на ИК или ЯМР спектроскопию.

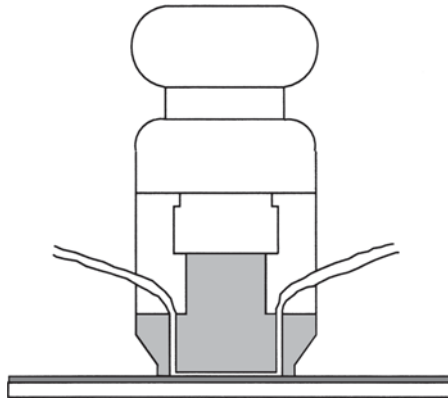


Рис. 5.27. Головка элюатора в разрезе

5.8.5.3. Спектроскопические методы

Прямые фотометрические определения, которые позволяют проводить количественную оценку тонкослойных хроматограмм без деструкции аналитов, несмотря на связанные с этим методом особые трудности разрабатывалось очень интенсивно и не в последнюю очередь благодаря тому, что этот прямой метод оказался непревзойденным по своей гибкости и скорости. С 1967 года в продаже имеются коммерческие измерительные приборы, которые обеспечивают быстрое и количественное определение с границами обнаружения в области нг и воспроизводимостью результатов 3%.

Измерительные приборы для непосредственной обработки тонкослойных хроматограмм называются денситометрами или, часто, ТСХ сканерами. Они работают с источниками света в ультрафиолетовой и видимой частях спектра. С помощью оптической системы свет, выходящий из монохроматора, направляется на поверхность сорбционного слоя. Диффузно отраженный от хроматографического слоя свет улавливается затем установленным под определенным углом фотоумножителем.

Разделенные зоны сканируются лучом света с подходящей геометрией и длиной волны. Измеренная таким образом разность между оптическим сигналом слоя, содержащего и не содержащего пробу, соотносится с количеством вещества. При измерении ремиссии речь может идти как об абсорбции, так и о флуоресценции. Примерно от 80 до 85% всех количественных оценок ТСХ являются измерениями ремиссии в УФ диапазоне, от 10 до 15% – измерениями флуоресценции и менее чем 3% – в видимой области. Наиболее важная часть этих методов в отличие от часто использовавшегося ранее измерения пропускания (метод проходящего света):

- используемый рабочий диапазон в УФ не ограничен собственной абсорбцией материала носителя (около 350 нм для стекла) и простирается от 200 до 800 нм;
- дефекты слоя (например, неравномерная толщина слоя) мало влияют на измерение ремиссии, так что можно достичь лучшего соотношения сигнал/шум.



Направленный на слой сорбента луч света отражается от многих частиц, причем, в конечном счете, все направления в пространстве равнозначны. Фотоумножитель регистрирует свет, падающий под определенным углом. Если в пределах освещенной поверхности ТСХ нет ни одного пятна, то получается фоновое значение ремиссии R_0 , которое зависит от размера зерна, толщины слоя и, вследствие поглощения света слоем силикагеля, — также от длины волны. Эта ремиссия уменьшается, если в пределах освещенной поверхности находится вещество, поглощающее при используемой длине волны. Обычно компонентами ТСХ спектрофотометра или денситометра являются источник света, монохроматор, приемник и усилитель. Чтобы полностью использовать гибкость метода, необходимо, чтобы поглощение и флуоресценцию можно было измерять при помощи одного и того же устройства. Обычно используются два источника света, а именно: дейтериевая лампа для ультрафиолетовой области и вольфрамовая лампа для видимой области. Ксеноновые лампы можно использовать с определенными ограничениями во всем интересующем спектральном диапазоне. Для измерений флуоресценции используют ртутные лампы, преимуществом которых являются узкие спектральные линии, обеспечивающие высокую интенсивность. Для разложения света в спектр в самом простом случае можно использовать фильтр, при этом, однако, для измерения будут доступны только определенные длины волн. Напротив, решеточные монохроматоры являются более универсальными, так как позволяют устанавливать оптимальную длину волны.

ИЗМЕРЕНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ

Принцип этого метода схематически показан на рис. 5.28. Он применим для веществ, которые поглощают в видимом или ультрафиолетовом диапазоне. Измерения проводят в области от 200 до 800 нм. Выбрав подходящую длину волны, на которой наблюдается поглощение у анализируемых веществ, сканируют поверхность тонкослойной пластинки и измеряют интенсивность отраженного света (рис. 5.28). При этом сканируются только зоны, на которых были нанесены стартовые пятна. Таким образом, для того чтобы денситометр обнаружил на пластинке вещества, необходимо, чтобы нанесение проб происходило на строго определенные позиции, что гарантировано применением соответствующих приборов для нанесения проб.

Особенность измерения ремиссии состоит в том, что закон Ламберта–Бера, который в абсорбционной спектрометрии устанавливает линейную связь между

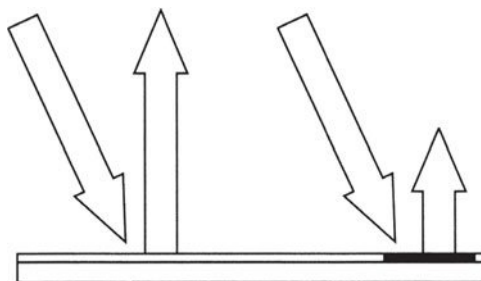


Рис. 5.28. Принцип измерения поглощения света

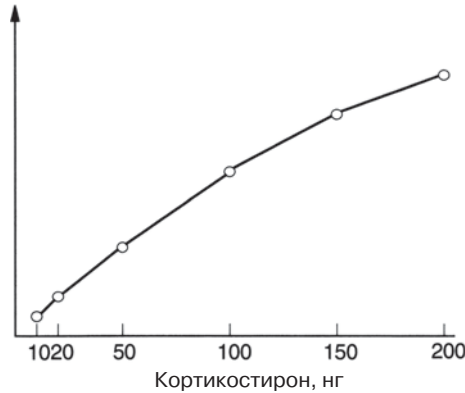


Рис. 5.29. Калибровочная кривая при измерении поглощения света

поглощением и концентрацией вещества, здесь не выполняется. Математически однозначная функциональная зависимость до сих пор не установлена. При принятии определенных приближений концентрация c выражается через функцию Кубелки–Мунка:

$$c = \frac{S(1-R)^2}{\varepsilon 2R},$$

где S – коэффициент рассеяния, характеристичный для пластинки; ε – коэффициент поглощения; R – степень ремиссии.

На рис. 5.29 в качестве примера показана калибровочная кривая для кортикостерона. Для небольших количеств вещества в ограниченном диапазоне получается приблизительно линейная зависимость. Нелинейные калибровочные для больших количеств вещества могут быть вычислены относительно просто с помощью мощных персональных компьютеров. Похожие регрессионные функции имеются также в современных интеграторах. Границы обнаружения для метода измерения абсорбции находятся в области нескольких нанограмм.

МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Определение флуоресцирующих веществ может быть очень чувствительным благодаря тому, что для возбуждения вещество облучают ультрафиолетовым светом, а измеряют флуоресценцию при больших длинах волн. Для этого перед фотоумножителем устанавливают оптический фильтр, который ослабляет возбуждающий свет и пропускает только длинноволновую флуоресценцию. Принцип измерения флуоресценции представлен на рис. 5.30.

Измерение флуоресценции в отличие от измерения поглощения обладает некоторыми особенностями. Оно очень селективно, так как данное вещество может быть охарактеризовано как по спектру возбуждения, так и по спектру эмиссии. Измерения флуоресценции в широком диапазоне дает линейную связь между количеством вещества и измеряемым сигналом. Измерения флуоресценции в 10–1000 раз более чувствительны, чем измерения поглощения. В отдельных слу-

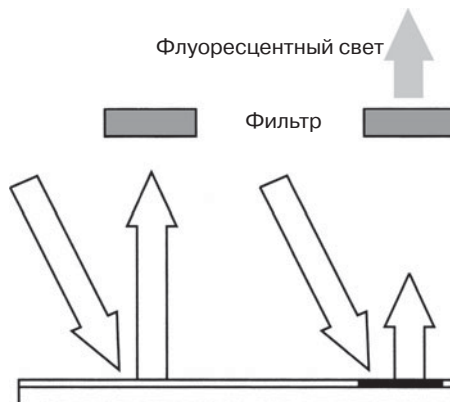


Рис. 5.30. Принцип флуоресцентного анализа

чаях границы обнаружения лежат в нижнем пикограммовом диапазоне. Так как интенсивность флуоресценции пропорциональна интенсивности возбуждающего света, выгодно использовать высокоэнергетичные источники света, как, например ртутную лампу высокого давления с линейчатым спектром в области от 254 до 578 нм. Спектр линий Hg лампы высокого давления представлен на рис. 5.31.

Однако с помощью измерения флуоресценции можно определять только определенные классы веществ. Флуоресценция возникает при возбуждении, например, афлотоксинов, полициклических ароматических углеводородов, хининсульфата и т. д., которые детектируются, благодаря этому, с высокой чувствительностью. Преимуществом является высокая селективность этого метода; подавляющее большинство соединений не флуоресцируют и вследствие этого не детектируются. Флуоресценция в широком диапазоне пропорциональна количеству вещества и, прежде

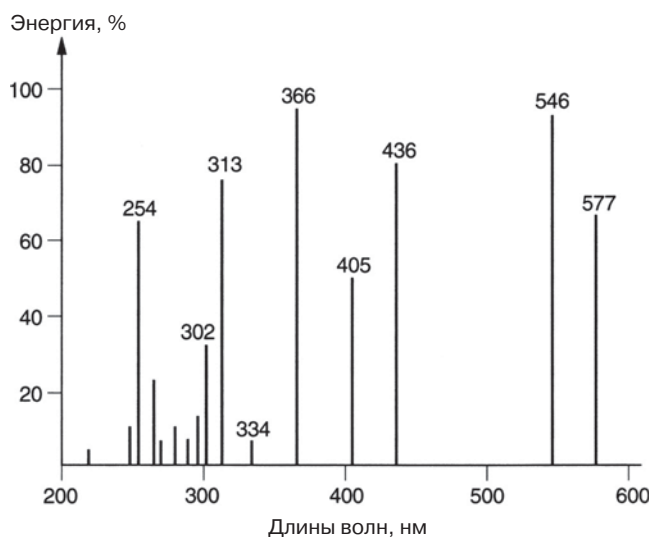


Рис. 5.31. Линейный спектр ртутной лампы высокого давления

всего, не зависит от формы пятна и геометрии поверхности. Более того, измерение флуоресценции в большинстве случаев возможно для существенно меньших количествах вещества в пятне, где не подходит измерение ремиссии.

Количественная оценка тонкослойных хроматограмм возможна также с помощью более приемлемого по цене ручного сканера вместо дорогого денситометра. При этом пластинка сканируется с помощью ручного сканера с высоким разрешением, и результат сохраняется в компьютере в виде картинки. Подпрограмма, содержащаяся в программном обеспечении, обеспечивает затем ее дальнейшую обработку. При этом зоны бесцветных веществ на пластинке нужно проявить с помощью дериватизации [5.13].

ПОСТХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ

Непосредственная обработка хроматограммы предполагает, что исследуемые вещества либо уже обладают подходящими оптическими свойствами, либо могут быть превращены с количественным выходом в оптически регистрируемые производные. Поэтому постхроматографическая химическая реакция совершенно уместна также при оптической обработке результатов разделения. Здесь следует особо упомянуть получение флуоресцирующих производных, так как возможности детектирования с помощью измерения флуоресценции существенно увеличиваются. Поэтому постхроматографическая дериватизация с получением флуоресцирующих производных играет значительную роль в анализе окружающей среды или при определении физиологических или лекарственных веществ в биологических жидкостях.

Обычное опрыскивание ведет к плоховоспроизводимым результатам и, как правило, связано также с ухудшением соотношения сигнал/шум. Тем не менее, опрыскивание можно улучшить с помощью полностью автоматизированных устройств. Погружение позволяет достичь более равномерного распределения проявителя по пластинке, чем опрыскивание. Разумеется, как погружение, так и извлечение должны происходить равномерно, так как иначе могут появиться похожие на границу фронта следы растворителя, которые мешают при оптической обработке результатов.

Автоматизированное устройство погружения гарантирует такое равномерное вертикальное движение, причем время нахождения в погруженном состоянии между 1 и 10 с можно выбрать заранее. Таким образом, можно стандартизировать условия погружения.

5.8.6. Методы денситометрии

Большинство коммерчески доступных денситометров — это так называемые щелевые сканеры. ТСХ пластинка перемещается в направлении измерения под освещенным окном сканера в форме щели с относительно небольшой шириной примерно от 0,05 до 1,0 мм. При этом ширину окна выбирают таким образом, чтобы охватить пятно целиком. При такой непосредственной оптической обработке пятна получают усредненное значение оптического сигнала. Так как, однако, каждая зона вещества имеет свой собственный концентрационный профиль, сигнал нелинейно зависит от количества вещества [5.14].

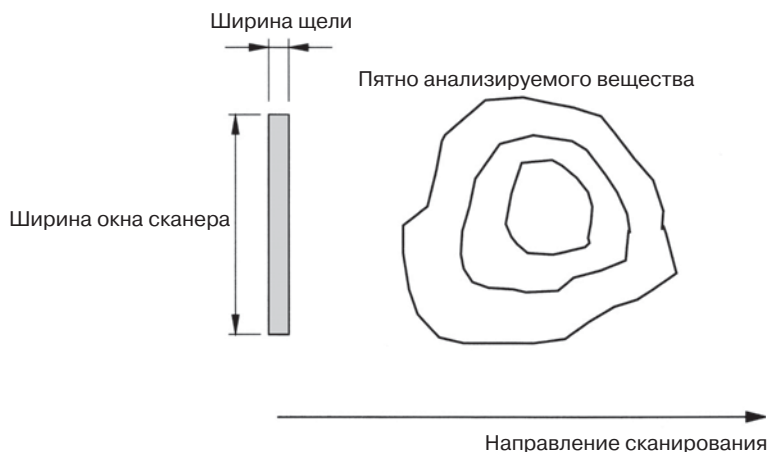


Рис. 5.32. Щелевой сканер

При уменьшении ширины щели интенсивность сигнала увеличивается, так как интегральное измерение происходит преимущественно в центре зоны вещества, как показано на рис. 5.32. При этом следует обратить внимание, с одной стороны, на то, чтобы сканирование проходило точно через центр пятна, а с другой стороны, на то, что возрастают шумы, обусловленные уменьшением интенсивности света. В качестве преимущества можно назвать в целом более высокую интенсивность измеряемого сигнала, а недостатком является зависимость интенсивности сигнала от ориентации измеряемого пятна относительно измерительной щели. Для щелевого сканера проблемой является то, что, кроме измерений при самых низких концентрациях, зависимость сигнала от концентрации является нелинейной не только вследствие зависимости Кубелки–Мунка, но также из-за интегрального характера измерения.

Эту нелинейность можно преодолеть с помощью так называемого точечного сканера, принцип функционирования которого представлен на рис. 5.33. В этом

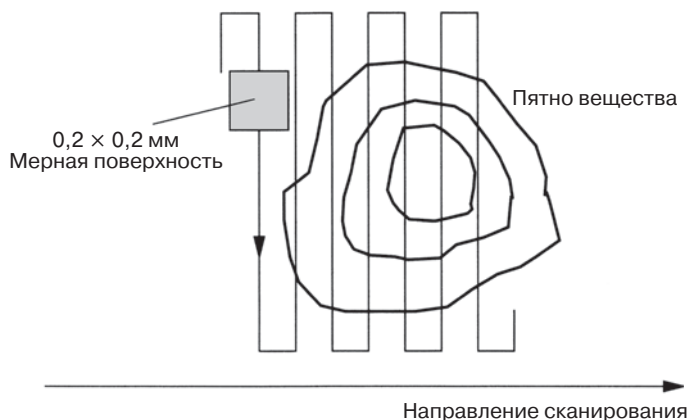


Рис. 5.33. Точечный сканер (меандровый сканер)

методе маленькая измерительная ячейка, имеющая форму квадрата (например, $0,2 \times 0,2$ мм), сканирует пятно вещества, охватывая его по представленному на рисунке контуру. Квадратная поверхность и соответствующие координаты перемещения пластинки гарантируют, что каждая точка пятна будет измерена. Сигнал линеаризуется функцией Кубелки–Мунка или другой подходящей функцией и интегрируется по всей ширине сканирующего окна. Точечные сканеры показывают, таким образом, более широкий линейный диапазон. При этом калибровка оказывается более простой. Этому преимуществу сопутствуют, тем не менее, два недостатка.

Во-первых, из-за более низкой в целом интенсивности света падает соотношение сигнал/шум и, вместе с тем, ухудшается предел обнаружения, а, во-вторых, преобразование сигнала приводит к появлению новых ошибок. Часто дополнительные проблемы создает требуемое в этом методе двойное интегрирование.

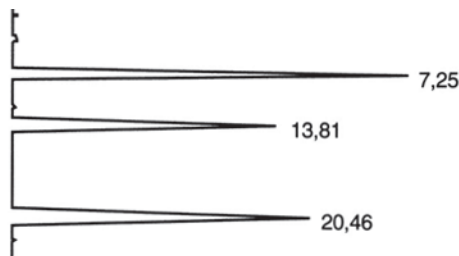
Штрихообразные стартовые зоны являются предпосылкой для наилучшего разрешения, которое можно достичь с помощью выбранной ТСХ системы. Оптимизация разрешения благоприятно сказывается на всех приложениях ТСХ: качественном, количественном и препаративном. При денситометрической обработке результатов разделения и при точечном нанесении пробы сканирующая щель должна целиком захватывать ширину трека. Обработка штрихообразно нанесенных проб происходит путем частичного измерения, то есть щель сканирует от половины до двух третей исходной длины штриха. Так как все пробы наносили с одинаковой длиной штриха, их сканируемые части также равны между собой.

5.8.7. Интегрирование

В самом простом случае измеряемый сигнал устройства для обработки ТСХ регистрируется с помощью аналогового самописца, и высоты пиков измеряются вручную. Этот метод используется для небольшого количества анализов или при частой смене решаемых задач. Сегодня для количественной обработки, как правило, используются системы с компьютерным управлением. Применение находят те же приборы, что и в работе с колоночной хроматографией.

Так как условия хроматографии и свойства слоя могут несколько изменяться от пластинки к пластинке, на каждую пластинку наносятся калибровочные стандарты и все данные анализа сравниваются с ними. Чаще всего анализируются три или более различных концентрации стандарта, и по результатам анализа строится калибровочная криволинейная или прямолинейная зависимость [5.15].

Из опыта известно, что в большинстве случаев высоты пиков определяются с лучшей воспроизводимостью и достоверностью. Однако для пятен с «хвостами» ошибка определения высоты пика очень велика. Оценка по площади допустима только тогда, когда пятно полностью отделено и, таким образом, можно точно определить положение базовой линии. Рис. 5.34 показывает в качестве примера протокол анализа, печатаемый интегратором. Так как тонкослойная хроматограмма не изменяется во времени, то интегрирование можно повторять сколь угодно часто или, соответственно, повторить измерения при других длинах волн.



Файл 1	Метод 5	Номер анализа 9	Индекс 2
Аналитик:	JB		
Проба 1		Партия 25	
Название	Конц.	Время удерживания	Разделение пиков
Кофеин	100,898	7,25	01
Фенацетин	99,699	13,81	01
Пропиофен	100,708	20,46	01
			Площадь
			292241
			136619
			210728

Рис. 5.34. Полный протокол анализа, печатаемый интегратором

В случае сложных хроматограмм, например, смесей природных соединений или проб из окружающей среды, интегрирование и обработку часто проводят на двух или более длинах волн. Другой метод обработки ТС хроматограмм представляет собой видеоинтегрирование, когда пользователь может сам ставить метки, определяющие пределы интегрирования, в любом положении на мониторе. Все же лучше сначала попытаться оптимизировать разделение. Никакие последующие манипуляции не могут заменить хорошую хроматограмму.

5.8.8. Комбинированные методы

Идеология создания комбинированного ТСХ-ИК-Фурье метода похожа на ту, что существует для УФ спектроскопии. Была разработана «диффузная отражательная инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье» (ДОИК-Фурье), которая позволяет детектировать в хроматографическую зону до 0,1 мкг вещества. Метод заключается в том, что ИК-Фурье спектры разделенных на пластинке зон веществ регистрируются *in situ* с последующей идентификацией и количественной обработкой. Очевидно, что идентификация этим методом существенно превосходит метод *in situ* УФ спектроскопии. В случае количественного определения эти методы сравнимы [5.16]. К сожалению, не все области длин волн одинаково доступны, из-за собственного поглощения силикагеля измерения возможны лишь в диапазоне от 3500 до 1350 см⁻¹. Измерения должны проводиться в отсутствие воды и СО₂.

Комбинация ТСХ с ВЭЖХ служит для разделения и скрининга, когда исследуемые вещества элюируются с пластинки и разделяются в итоге с помощью ВЭЖХ [5.17]. Комбинация ТСХ с масс-спектрометрией возможна только при наличии

специального интерфейса. При этом возникает значительно меньше технических трудностей, как в случае соответствующей комбинации с ВЭЖХ, так как в ТСХ хроматограмма свободна от растворителя и, таким образом, перед измерением подвижную фазу не нужно отделять с помощью сепаратора.

5.9. Достоверность результатов ТСХ анализа

При последовательной инструментализации ТСХ удается получить коэффициент вариации результатов, близкий к 1% и в редких случаях более 3%. Если наблюдаются большие отклонения, то их следует отнести к недостаткам хроматографической техники. Наряду с недостаточным разделением наиболее часто наблюдаемой ошибкой является искривление треков на хроматограмме, вызванное примесями из матрицы, в которой находился аналит. Этот эффект можно элиминировать или значительно уменьшить с помощью подходящего контроля газовой фазы.

После исключения тривиальных ошибок ТСХ точность метода можно дополнительно повысить следующими способами:

- штрихообразное нанесение проб и сканирование с шириной щели не более 2/3 длины штриха,
- обработка точно нанесенных проб с помощью компьютера, который точно центрирует положение щели на максимум пятна каждой пробы.

Компьютерное управление дает возможность полностью автоматизировать поиск трека и оптимизировать считывание каждой отдельной хроматографической зоны. Таким образом, точность нанесения пробы и незначительные искажения в процессе разделения больше не влияют на точность анализа. Высокая производительность ВЭТСХ требует, соответственно, эффективного метода обработки данных, для чего рекомендуется использовать компьютерную систему.

В рутинном анализе, то есть при повторяющейся задаче, вручную необходимо делать лишь следующие операции: поместить хроматограмму в сканер, вызвать сохраненные на диске параметры обработки и задать их сканеру, затем (по истечении периода измерения) получить готовый протокол анализа.

5.10. Сравнение ТСХ и ВЭЖХ

В обоих методах, как в ТСХ, так и в ВЭЖХ, речь идет о разделении с помощью жидкостной хроматографии. Оба метода используют одинаковые принципы хроматографического разделения, то есть одни и те же стационарные и подвижные фазы. Таким образом, их приложения к различным проблемам разделения очень близки. Различие состоит в первую очередь только в том, что ВЭЖХ проводят в закрытой, а ТСХ, напротив, в открытой системе. Однако вопрос о том, можно ли отказаться от одного из двух методов, не существует. ВЭЖХ и ТСХ обе необходимы для различных целей. Вопреки бытующему подчас мнению, было установлено, что по сравнению с колоночной хроматографией ТСХ может обладать целым рядом преимуществ, которые позволяют показать, что она еще и сегодня заслу-



живает должного внимания. Решающим является то, в какой мере возможности метода отвечают требованиям по разрешающей способности, правильности и точности при решении поставленной задачи [5.18].

Аналитическая лаборатория средней величины производит в год около 160 000 газовых анализов, 130 000 ВЭЖХ анализов и около 35 000 ТСХ разделений. Во всех группах соотношение рутинных анализов и работ по разработке метода разделения примерно одинаково. Если за единицу измерения принять хроматограмму, — все равно, калибровочную или аналитическую, — получится в год на одного сотрудника 6400 ГХ-, 7200 ЖХ- и 7000 ТСХ результатов [5.19].

Тонкослойная хроматография по скорости и производительности при минимальном потреблении химических реагентов стоит на первом месте среди всех хроматографических методов разделения.

Открытая система с тонкослойной пластинкой обладает, например, тем большим преимуществом по сравнению с колонкой, что хроматографический процесс можно наблюдать непосредственно практически на каждой стадии разделения, включая неэлюируемые компоненты, если речь идет о разделении окрашенных веществ, присутствующих в достаточно больших количествах. Кроме того, так как ТСХ пластинка используется только один раз, здесь не существует опасности контаминации и старения хроматографического слоя сорбента.

ТСХ незаменим для качественного анализа. Более того, существует обширная палитра химических реакций для обнаружения разделенных компонентов. Планарную хроматографию часто выбирают как для больших серий проб с одинаковым качественным составом (например, в фармацевтическом контроле качества), так и там, где встречаются новые, в большинстве своем не повторяющиеся задачи. С другой стороны, существуют трудные задачи, исходя из опыта решения которых требуются ВЭЖХ колонки.

Каждому практику известно, что разрешающая способность ТСХ пластинки, которая позволяет разделить максимум от 15 до 20 пиков, не может конкурировать с разрешающей способностью хорошей хроматографической колонки, где на одной хроматограмме разделяется свыше ста пиков. Существенно более высокую пиковую емкость в ТСХ удастся получить с помощью двумерного метода. Поскольку на практике в колоночной жидкостной хроматографии имеется все же меньше подлежащих элюированию компонентов, то в среднем разрешающая способность хороших колонок соответствует разрешающей способности ГХ колонок соответствующего размера.

Вопрос о превосходстве метода колоночной или тонкослойной хроматографии принципиально вообще нельзя ставить в такой форме, это должно решаться скорее в зависимости от случая к случаю. Это решение далеко не всегда просто принять. В табл. 5.3 для этого перечислено несколько преимуществ обоих методов.

К сожалению, метод ТСХ является в значительной степени эмпирическим, и из-за плохо определенных физико-химических граничных условий его результаты трудно переносимы на колонку. Все же с помощью ТСХ можно систематически

Таблица 5.3. Преимущества ТСХ перед ВЭЖХ

Преимущества тонкослойной хроматографии	Преимущества колоночной жидкостной хроматографии
Одновременный анализ многих проб	Небольшое влияние внешних факторов на хроматографический процесс
Прямое сравнение с аутентичными чистыми веществами	Отсутствует изменение веществ под действием света или кислорода
Наблюдение и распознавание хроматографического процесса в целом	Лучшее выполнение основных физических законов
Применение многочисленных рабочих методик для расчета лучших условий разделения	Вследствие этого более легкое предсказание результатов
Повышение селективности с помощью специфического группового детектирования, которое в пространстве и во времени отделено от процесса хроматографии	Более простая автоматизация систем и, следовательно, уменьшение случайных ошибок (влияния человеческого фактора)
Большая свобода в выборе стационарной и подвижной фаз	Быстрая смена стационарной фазы переключением колонок
Незначительное влияние примесей	Эксклюзионная хроматография макромолекул
Пилотные методы для оптимизации элюента в ВЭЖХ	Как правило, оптимальные по цене методы

тестировать пригодность систем растворителей для колоночной хроматографии и оценивать параметры удерживания. Оба метода применяются в крупных аналитических лабораториях как партнеры, а не как конкуренты. Для относительно небольших и хорошо планируемых специальных исследований, например, в производственных лабораториях, в большинстве случаев должен преобладать метод ТСХ.

Хроматография, как таковая, занимает в аналитике, безусловно, центральное место. Все методы в отдельности соответствуют определенному набору основных задач. При анализе большого количества проб инструментальная ТСХ превосходит ВЭЖХ благодаря значительному выигрышу во времени. Есть целый ряд задач, при решении которых инструментальная ТСХ превосходит все остальные хроматографические методы. Табл. 5.4 показывает некоторые примеры применения обоих методов. Типичным примером является скрининг наркотиков и лекарственных

Таблица 5.4. Примеры использования ТСХ и ВЭЖХ

ТСХ	ВЭЖХ
Контроль партий продукта и его качества	Хороший серийный контроль и рутинный анализ
Оценка стабильности продуктов	Контроль качества в фармацевтике
Тестирование единообразия состава при проверке медицинских препаратов	Проверка стабильности и одновременное определение многих биологически активных веществ
Лекарственный мониторинг в области клинической химии	Исследование биологических жидкостей после соответствующей подготовки
Применение в области судебной экспертизы и токсикологии	Разделение биомолекул (белков)
Методы скрининга в экологии	Разделение «электрозаряженных» веществ
Нарко- и допинг-контроль	

средств [5.20]. Конечно, оборудование рабочего места должно соответствовать постановке задачи.

5.11. Выводы и перспективы

Современная тонкослойная хроматография является микроаналитическим методом разделения и определения, который используется в приложениях от препаративных разделений до анализа следовых количеств веществ. Она охватывает обширную область разделений от скоростного анализа в синтетической лаборатории с получением чисто качественных данных до сложных количественных определений в следовом анализе. Существующее приборное оформление и автоматизация ТСХ показывают ее как метод разделения, который прост в употреблении, оптимален в ценовом отношении, обладает отличной селективностью и по своей чувствительности соответствует ВЭЖХ.

Для улучшения избирательности хроматографического разделения существуют различные приемы. В зависимости от размера частиц сорбента различают нормальную ТСХ, использующую сорбенты с большим размером зерна между 10 и 40 мкм, и ВЭТСХ, использующую сорбенты с малым размером зерна между 3 и 10 мкм. Так как анализируемые вещества после разделения остаются на пластинке и доступны дальнейшим определениям, то тонкослойная хроматограмма является как бы «аналитической дискетой», которая может быть обработана независимо от собственно процесса разделения.

К тому же для ТСХ существует множество специфических возможностей детектирования, основанных как на пред- и постхроматографической микрохимической дериватизации, так и на ряде спектрометрических методов. В современной инструментальной ТСХ/ВЭТСХ возможно как регистрация *in situ* ИК-Фурье и УФ вид спектров, так и *in situ* комбинирование с масс- и рамановской спектроскопией. Преимущество планарной хроматографии состоит в том, что все мешающие при последующих измерениях аналитов компоненты подвижной фазы могут быть удалены с пластинки.

Ферментативные методы детектирования открывают для ТСХ/ВЭТСХ возможность делать заключение о биохимических свойствах разделенных веществ. Кроме того эти методы детектирования отличаются высокой избирательностью и чувствительностью. С ними вполне достижима граница обнаружения в области пикограммов. В табл. 5.5 приведен обзор различных областей применения тонкослойной хроматографии.

Таблица 5.5. Области применения ТСХ/ВЭТСХ

Область применения	Доля
Фармация	40%
Биохимия, судебная экспертиза, клиническая химия	20%
Экология	15%
Анализ пищевых продуктов, косметология	10%
Неорганические вещества	5%
Прочие области	10%

5.11.1. ТСХ как метод скрининга

Тонкослойная хроматография может применяться как в количественном, так в качественном анализе. Так как на одной пластинке расположено рядом от 20 до 36 хроматографических дорожек (треков), пробы и стандарты могут элюироваться одновременно в одной системе. Соответственно, тонкослойная хроматография отлично подходит для скринингового анализа. Многие одинаковые пробы можно анализировать параллельно, учитывая общность поставленной задачи. Этот метод позволяет определить, содержится ли определенное соединение в исследуемом материале или нет, соответственно, предоставлено ли чистое вещество или нет.

Во многих случаях на практике требуется быстрый ответ, находится ли концентрация искомого вещества заметно ниже определенной границы, в пределах допустимых концентраций или явно выше этих значений. Из такой постановки задачи и полуколичественных определений вытекает решение, нужно ли анализировать предоставленную пробу или нет. Если ее нужно исследовать более точно, то проводится количественный анализ. При этом калибровочные стандарты и пробу хроматографируют в одной системе. В качестве очень экономного метода при анализе очень большого числа проб тонкослойная хроматография особенно подходит для анализа пищевых продуктов, фармацевтических и наркотических средств. Этот метод выбирают также для анализа окружающей среды, например, для анализа почв.

5.11.2. ТСХ как микроаналитический метод анализа

Ввиду все возрастающей инструментализации и автоматизации планарную хроматографию причисляют к наиболее чувствительным методам анализа, которые имеются в распоряжении аналитика. Фондом химической промышленности Германии она по значению приравнивается к ВЭЖХ, если, например, речь идет об определении следов органических веществ в питьевой воде. При этом селективность метода складывается из селективности разделения и специфичности детектирования. Если исключить двумерную и многомерную версии, то планарная хроматография не обладает высокой разделяющей способностью. Этот недостаток компенсируется, однако, высокой специфичностью детектирования.

Селективность разделения определяется хроматографической системой. Многочисленные модификации силикагеля явственно расширили палитру сорбентов в последние годы. То же самое справедливо и для методов разделения, развитие которых в последние годы сильно расширило возможности применения современных ТСХ и ВЭТСХ в аналитике.

5.11.3. Современные методы разделения

Кроме известных методов разделения, таких как двумерная, ступенчатая и многократная хроматография, круговое и антикруговое элюирование, сегодня существует ряд более эффективных методов работы. Автоматическое многократное разделение находит особенно широкое применение в анализе следовых количеств. В методе автоматического многократного элюирования (АМЭ) преимущества

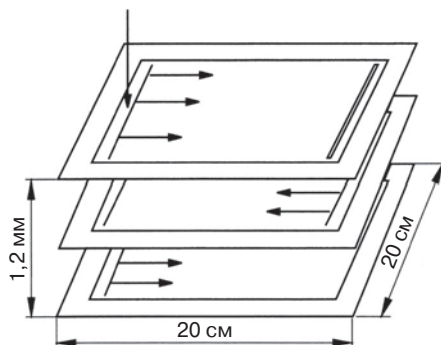


Рис. 5.35. Схематическое изображение планарной хроматографии высокого давления на длинных пластинках (ПХВД)

многократного, ступенчатого и градиентного элюирования объединены в одном хроматографическом разделении. Дозирование элюента и промежуточное высушивание автоматизированы. Вследствие того, что движение фронта растворителя ограничивается несколькими миллиметрами, причем следующая подвижная фаза мигрирует выше фронта предыдущей, получаются очень узкие и четкие зоны веществ. В противоположность ВЭЖХ здесь градиент начинается всегда с полярного и кончается неполярным растворителем. Положение зон на одной и той же хроматограмме хорошо воспроизводится (коэффициент вариации от ± 1 до 2%). Это соответствует воспроизводимости величины k' в ВЭЖХ. Ширина зон в направлении движения составляет максимум 2 мм.

В методе с принудительным потоком преимущество ТСХ, которое состоит в возможности параллельного проведения многих анализов, объединено с преимуществами ВЭЖХ, которая позволяет контролировать поток за счет принудительной подачи элюента и достигать равновесия между стационарной фазой и элюентом. Для этого за счет внешних сил увеличивают скорость движения подвижной фазы по пластинке, что сильно сокращает время, затрачиваемое на разделение. Причем два типа круговых хроматографических процессов нужно отличать от двух типов линейных хроматографических процессов.

К круговым хроматографическим методам разделения принадлежат ВЭПХ (высокоэффективная планарная хроматография) и ВПХ (вращательная планарная хроматография). К линейным методам разделения относят ПХВД (планарную хроматографию под давлением) и ПХВД на длинных пластинках, как это показано на рис. 5.35. При ПХВД за счет удлинения пути разделения число теоретических тарелок возрастает от $N = 50\,000$ до 70 000. Из-за трудностей герметизации штапеля пластинки от протекания органического растворителя этот метод до сих пор не нашел еще широкого применения.

5.11.4. Заключение

Тонкослойная хроматография является наиболее гибким хроматографическим методом разделения из тех, которые мы знаем. Она отличается превосходной селективностью и невысокой стоимостью. Соотношение цена—качество заметно

лучше, чем для других хроматографических методов. В последние годы заметно улучшились инструментализация и автоматизация метода. Так как все большее значение приобретает стоимость одного анализа, то ТСХ переживает сегодня явный подъем. Она представляет собой выгодный по цене метод анализа, когда речь идет о том, чтобы за короткое время получить много данных с минимальным риском для систематических ошибок. При ВЭЖХ, напротив, затраты на утилизацию отходов, гигиену рабочего места и заботу об окружающей среде высоки.

ГЛАВА 6

ИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Создание ионной хроматографии (ИХ) как универсального практического метода анализа является одним из наиболее значительных достижений инструментального анализа последних лет. Она была предложена в 1975 году [6.1] и за короткое время развилась из одного из методов детектирования, использовавшегося лишь для небольшого числа ионов, в самостоятельный вид анализа. Ионная хроматография черпает свою исключительную разделяющую способность, с одной стороны, из тех же источников, которые присущи ВЭЖХ, а, с другой стороны, систем детектирования, которые открывают для обнаружения ионных соединений область ppb концентраций.

В 80-е годы ИХ превратилась в важный аналитический метод, причем вклад в ее развитие внесли многочисленные индивидуальные разработки. Наряду с общим развитием оборудования для ВЭЖХ, которые также сказались и на ИХ, специально для разделения ионов были созданы разнообразные колонки, использующие различные механизмы разделения. Кроме того, сегодня в распоряжении имеются детекторы по электропроводности с очень низким уровнем шума и устройства химического подавления проводимости элюента.

Рассматривая развитие приборостроения для ИХ, нужно учитывать тесную связь этого метода с ВЭЖХ, так как ИХ представляет только один из вариантов жидкостной хроматографии, особенности которой обусловлены материалом колонки и видами детекторов. Но ионохроматографические разделения нуждаются в специальном материале колонок, который, к тому же, неустойчив к таким обычным элюентам ВЭЖХ, как метанол или ацетонитрил. Основой детектирования ионных соединений является измерение электрической проводимости. Так как, однако, используемый элюент сам обладает электрической проводимостью, то для повышения чувствительности детектора эту проводимость нужно подавлять. Для этого существуют два разных способа (химическое подавление и электронное подавление) проводимости элюентов. У обоих процессов есть свои преимущества и недостатки; какой метод применять – вопрос поставленной аналитической задачи. Из-за простоты применения и широты линейного диапазона в рутинном анализе предпочитают электронное подавление. Для области следовых и ультранизких количеств необходимо химическое подавление. Хотя до сих пор фирма Dionex была лидером на рынке в области ионной хроматографии как единственный поставщик приборов с патентованным химическим подавлением, в последнее время эта техника предлагается также фирмой Metrohm. Раньше при выборе устройства нужно было сразу решаться на один из двух методов подавления, так как замена одного метода другим – дорогое удовольствие. Сегодня ионные хроматографы позволяют использовать обе техники.

В хроматографии ионов всегда нужно различать анализ анионов и анализ катионов. Для одной пробы на соответствующем образом выбранной колонке мо-

гут определяться в одном хроматографическом анализе либо отрицательно, либо положительно заряженные ионы. В двухмерной хроматографии проба идет на две отдельные колонки, поэтому возможно одновременное определение всех ионных компонентов.

В то время как в неорганическом анализе для определения металлов уже давно в распоряжении имеется атомная спектроскопия, ионная хроматография закрывает пробел, позволяя быстрое и чувствительное определение анионов. Однако по сравнению с атомной спектроскопией у ионохроматографического анализа катионов металлов есть то преимущество, что при этом определяется валентность, соответственно, координационное состояние отдельных катионов. Первая норма немецкого промышленного стандарта (нем.: DIN) для ионохроматографического определения анионов появилась в 1988 году [6.2].

По механизму разделения можно различить три ионохроматографических метода:

- ион-парная хроматография,
- ионообменная хроматография,
- ион-эксклюзионная хроматография.

Наряду с этим имеются дальнейшие разработки, принцип разделения которых основывается на комбинации ионообменной и обращеннофазовой хроматографии и которые представляют собой разновидность многомерной хроматографии. В большинстве случаев термин «ионная хроматография» используют в узком смысле ионообменной хроматографии.

6.1. Ион-парная хроматография

Ион-парная хроматография – это альтернатива ионообменной хроматографии. Смеси кислот, оснований и нейтральных веществ часто нельзя хорошо разделить методами ионного обмена. В этих случаях применяют ион-парную хроматографию. При этом в качестве стационарных используются фазы, разработанные для обращеннофазовой хроматографии и на которых проводится также наибольшее число хроматографических разделений в ВЭЖХ. Обращеннофазовая хроматография отличается особенной простотой применения при анализе неполярных соединений. Разумеется, очень многие вещества обладают ионным или сильнополярным характером, а потому часто очень слабо удерживаются на неполярной стационарной фазе или разделяются с недостаточной селективностью. Для решения таких аналитических проблем часто выбирают ион-парную хроматографию [6.3].

В подвижную фазу добавляют органическое ионогенное вещество, которое образует ионную пару с противоположно заряженным компонентом пробы. С химической точки зрения, это соль, которая для хроматографии представляет собой неионную органическую молекулу и может отделяться на обращенной фазе. Понятие образования ионной пары пришло из экстракции. Ион-парная экстракция – это техника, которая позволяет добавлением подходящего противоиона перевести ионные соединения из водной фазы в органическую фазу.

Для удерживания заряженных и, вместе с тем, сильно гидрофильных веществ на неполярной стационарной фазе (обращенная фаза) к подвижной фазе добавляют в большинстве случаев органическую соль — так называемый ион-парный реагент. В низких концентрациях ион-парные реагенты почти полностью диссоциированы. Ионизированные компоненты, подлежащие разделению, образуют с заряженными органическим ионам ион-парных реагентов ионные пары, которые удерживаются как незаряженные соединения [6.4]. Ионные пары образуются только при взаимодействии больших органических катионов и больших органических анионов. Разделение неорганических ионов с помощью этой техники невозможно.

В качестве ион-парных реагентов для удерживания анионов кислот в общем случае используются тетраалкильные соединения аммония. Для удерживания основных катионов особенно подходят алкилсульфонаты или алкилсульфаты [6.5].

Рис. 6.1 показывает механизм ион-парной хроматографии на примере органической сульфокислоты. Анионы сульфокислот образуют в подвижной фазе с избытком иона тетраалкиламмония электронейтральную ионную пару, которая может сорбироваться на гидрофобной поверхности обращеннофазового сорбента. У свободной кислоты или ее натриевой соли вследствие наличия электрического заряда никакого взаимодействия со стационарной фазой не происходит, и равновесие в значительной степени смещено в сторону присутствия сульфокислоты в растворе.

Удерживание исследуемых заряженных соединений в обращеннофазовой ион-парной хроматографии зависит от силы их взаимодействия в виде ионных пар со стационарной фазой. Другие ионы, например, ионы буфера и незаряженные соединения, например, молекулы растворителя в подвижной фазе конкурируют с этими ионными парами за адсорбцию на свободных активных центрах стационарной фазы.

Для ион-парной хроматографии подходит, в принципе, любая система ВЭЖХ без дополнительных требований к прибору. Уже простой системы, состоящей из

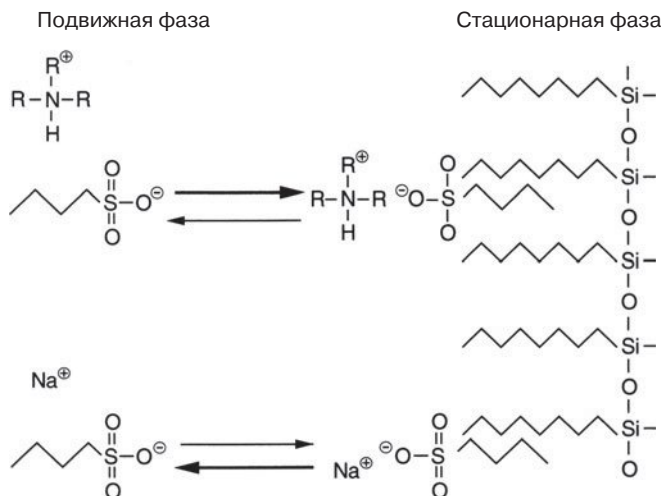


Рис. 6.1. Механизм ион-парной хроматографии

насоса, крана-инжектора, хроматографической колонки, детектора и самописца, достаточно для решения большинства задач. Сложные разделения компонентов, сильно различающихся по полярности, требуют оснащения прибора градиентной системой элюирования.

В качестве детектора во многих случаях можно использовать проточный УФ фотометр, причем особое внимание нужно обращать на противоион ион-парных реагентов. В то время как ион тетрабутиламмония не поглощает в ультрафиолете, такие противоионы, как бромид или йодид, поглощают ниже 220 нм. Поэтому в качестве противоиона следует выбирать только сульфат.

Ион-парная хроматография на обращенной фазе достаточно проста в применении. Простая наглядная теория дает пользователю возможность целенаправленной оптимизации условий хроматографического разделения. Самые важные правила для этого:

- оптимальный рН подвижной фазы, гарантирующий полную ионизацию разделяемых компонентов;
- рост удерживания с ростом концентрации ион-парного реагента в элюенте;
- рост удерживания с ростом доли воды в элюенте при постоянной концентрации ион-парного реагента;
- рост удерживания с ростом длины алкильных цепей, т.е. с ростом гидрофобности, ион-парного реагента при его постоянной концентрации;
- рост удерживания с ростом заряда компонентов пробы при постоянном составе элюента.

6.2. Ионообменная хроматография

Для разделения неорганических катионов и анионов, которые нельзя разделить с помощью ион-парной хроматографии, применяется ионообменная хроматография. При этом разделение анионов — это основная проблема ИХ. В то время как для анализа катионов сегодня имеются производительные методы атомной спектроскопии, такие как ААС и ИСП-ОЭС, анионы были долгое время предметом особого внимания аналитики. Классические методы мокрой химии являются в высшей степени трудоемкими из-за интенсивной пробоподготовки. В противоположность этому ИХ позволяет быстро получить результаты благодаря коротким временам разделения. Разумеется, нужно отметить, что время анализа часто лимитирует не разделение как таковое, а полное элюирование сильно удерживаемых посторонних компонентов матрицы, до того как может быть введена следующая проба. В течение последних лет ни один метод ВЭЖХ не развивался так же быстро, как ИХ [6.6].

Ионообменная хроматография из-за простоты может во многих случаях проводиться на обычном оборудовании для ВЭЖХ. Для высокочувствительных анализов вплоть до области ультраследовых количеств применяются специальные насосы, у которых головки и все соединения выполнены свободными от нержавеющей стали. Так как в ИХ наиболее широко применяется детектор по электропроводности, то лучше всего использовать системы, не содержащие металлических частей, чтобы исключить какие-либо загрязнения.

6.2.1. Механизм разделения

В ионообменной хроматографии в качестве стационарной фазы применяется полимерная или силикагельная матрица, на поверхности которой привиты кислотные или основные группы. Речь идет о ионообменном материале, похожем на тот, что применяется для удаления тяжелых металлов из сточных вод. Различие состоит в том, что в технике очистки сточных вод требуется как можно более полное удерживание ионных компонентов, в то время как в ионной хроматографии отдельные ионы в разной степени связываются с функциональными группами ионообменного сорбента и элюируются подвижной фазой. Для этого требуются специальные ионообменные сорбенты с низкой емкостью и высокой эффективностью.

В обращеннофазовой хроматографии механизм разделения довольно хорошо может быть описан на основе теории псевдрегулярных растворов с учетом параметров растворимости [6.7]. В ионной хроматографии, из-за введения ионных групп и применения в большинстве случаев водной подвижной фазы, взаимодействия коренным образом изменяются. Но и для ионообменной хроматографии были предложены модельные механизмы разделения. Так как детектирование проводится по электропроводности, то представляется разумным использовать в качестве элюента высокоочищенную воду, чтобы можно было зарегистрировать, таким образом, самые низкие концентрации ионов в проточной ячейке. Название этой техники разделения говорит о том, что имеет место процесс ионного обмена. Материал ионообменника уже перед вводом пробы нейтрализован противоионами, которые должны находиться и в подвижной фазе. Тогда при вводе пробы происходит обмен ионов подвижной фазы на ионы пробы на ионогенных центрах ионообменного материала.

В качестве примера более подробно рассмотрим этот процесс еще раз при разделении анионов. Колонка наполнена сильноосновной ионообменной смолой. В качестве элюента используется разбавленный водный раствор соли, анионы которого уравнивают ионообменник в колонке. После ввода раствора пробы анионы из пробы адсорбируются в колонке. Итак, ионный обмен происходит между ионами подвижной и стационарной фаз. Анионы подвижной фазы, которые теперь «обменены» с анионами пробы (отсюда и название «ионообменная хроматография»), мигрируют с катионами пробы по колонке. Так как дальнейший обмен в колонке происходит только с идентичными анионами, катионы пробы достигают детектора вместе с фронтом растворителя.

Неудерживаемые катионы пробы вместе с анионами подвижной фазы достигают детектора за мертвое время; образуется первый пик, который называется в ИХ часто «пик воды». В зависимости от вида и количества катионов водный пик может давать в итоге отрицательный или положительный сигнал. Адсорбированные анионы тем временем непрерывно обмениваются на анионы подвижной фазы, мигрируют вместе с элюентом и адсорбируются снова на ионите. Таким образом, устанавливается равновесный процесс между адсорбцией анионов из элюента и анионов пробы на ионите, на который накладывается движение подвижной фазы. При этом разделение анионов определяется их сродством к стационарной фазе.

Таблица 6.1. Типичный элюиционный ряд для анионов

1. Перхлорат	9. Гидрофосфат
2. Фторид	10. Сульфит
3. Ацетат	11. Сульфат
4. Хлорид	12. Иодид
5. Нитрит	13. Хромат
6. Бромид	14. Тиосульфат
7. Цианид	15. Сульфид
8. Нитрат	16. Роданид

Анионы элюируются по очереди согласно своему заряду, диаметру и полярности [6.8]. В табл. 6.1 приведена типичная последовательность элюирования анионов.

Ионный обмен происходит между ионами подвижной и стационарной фаз. Это значит, что при связывании каждого иона пробы со стационарной фазой освобождается один ион буфера и наоборот.

Концентрация ионов в подвижной фазе, проходящей через колонку, постоянна, изменяется лишь идентичность отдельных ионов.

Для детектирования ионов в водном растворе лучше всего подходит измерение электропроводности [6.9]. Хотя детектирование по электропроводности позволяет чувствительное измерение концентраций ионов в растворе, недостатком ионообменной хроматографии является то, что сам элюент должен быть ионогенным и поэтому обладает значительной фоновой проводимостью. Изменения проводимости между чистым элюентом и элюентом, содержащим ионы пробы, вследствие этого становятся очень малыми. Это приводит лишь к относительно небольшим сигналам анализируемых ионов на фоне базовой линии с высокой фоновой проводимостью элюента.

Если детектор по электропроводности комбинирует с ионообменной колонкой, то чувствительность определения зависит от различия в электрофоретической подвижности между ионами пробы и буфера. Если только эквивалентные проводимости буфера и пробы близки друг к другу, то это приведет к низкой чувствительности определения ионов как следствие незначительного изменения в проводимости элюента.

В настоящее время в ионной хроматографии с детектированием по электропроводности существуют два инструментальных метода подавления проводимости элюента:

- системы с химическим подавлением и
- системы с электронным подавлением.

Первыми коммерчески доступны стали приборы с химическим подавлением. Патентные права фирмы Dionex препятствовали производству и продаже таких систем другими фирмами. Патенты не только защищают рынок для определенного изобретения, но также удерживают независимых исследователей от того, чтобы они предпринимали принципиальные улучшения, так как они могли бы достичь финансовых преимуществ и какой-то амортизации своих инвестиций. Наоборот, изобретатели идут на то, чтобы разработать прибор с тем же целевым

назначением, но по другой технологии. Поэтому неудивительно, что такие вариации встречаются в течение последних лет. Значительное участие в развитии ионной хроматографии приняли поставщики устройств с «альтернативной» техникой, т.е. с электронным подавлением фоновой проводимости элюента.

Химическое подавление — это в любом случае более эффективный вариант и может применяться вплоть до области ультранизких количеств. Технически проще электронное подавление, которое не подходит для непосредственного определения ультраследовых количеств из-за очень малых различий в измеряемых проводимостях, но из-за простоты применения и широкой линейной области является лучшей альтернативой для многих задач анализа ионов. Оба метода подавления предлагаются на рынке фирмой Dionex и в последнее время также фирмой Metrohm.

6.2.2. Химическое подавление

Химическое подавление или, точнее, «ионная хроматография с химическим подавлением проводимости элюентов в сочетании с кондуктометрическим детектором», означает, что перед поступлением в детектор по проводимости элюент, обладающей высокой ионной силой, превращается в слабопроводящую среду, например, воду. Тем самым подавляется проводимость элюента. Это позволяет проводить высокочувствительное определение крайне низких концентраций ионов в области ppb-концентраций, принцип химического подавления представлен на рис. 6.2.

Существуют различные методы химического подавления, которые со временем все больше улучшались и совершенствовались. Табл. 6.2 показывает различные разработки фирмы Dionex. С новым, поступившим в продажу модулем подавления от фирмы Metrohm можно в 3–5 раз улучшать пределы определения ионов по сравнению с техникой без химического подавления. Этот модуль состоит из трех подавительных колонок, которые поочередно применяются для подавления,

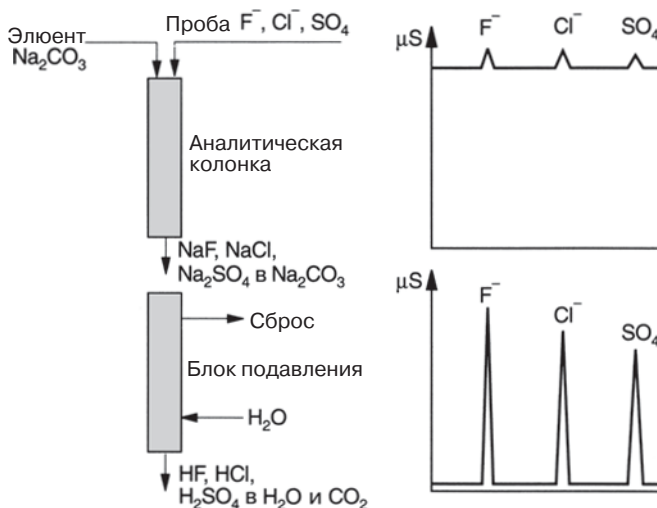


Рис. 6.2. Сравнение хроматограмм разделения ионов с подавительной колонкой и без нее

Таблица 6.2. Историческое развитие методов химического подавления

Год	Коммерческая реализация
1975	Двухколоночная система
1981	Подаватель на основе мембран из пустотелого волокна
1985	Микромембранный подаватель
1992	Электрохимический подаватель

регенерируются и промываются. При этом переключение отдельных колонок происходит либо автоматически вместе с переключением крана ввода пробы, либо вручную. Каждая колонка обладает достаточно высокой емкостью. Но чтобы, тем не менее, получать каждую хроматограмму в сопоставимых условиях, рекомендована работа со свежерегенерированной подавительной колонкой [6.10].

Химическое подавление значительно улучшает соотношение сигнал/шум, благодаря следующим факторам:

- сокращению фоновой проводимости электролита,
- повышению проводимости анализируемых компонентов и
- удалению противоионов.

6.2.2.1. Двухколоночные системы

Уже Смолл, Стивенс и Бауман, предложившие ионную хроматографию, работали с химическим подавлением, чтобы улучшать пределы обнаружения ионов. В первоначальном варианте ИХ, который затем, с внедрением в 1975 метода ИС, стал доступен коммерчески, была использована подавительная колонка. К детектору в этом случае была подключена вторая ионообменная колонка, так называемая подавляющая колонка; устройство такой двухколоночной системы показано на рис. 6.3.

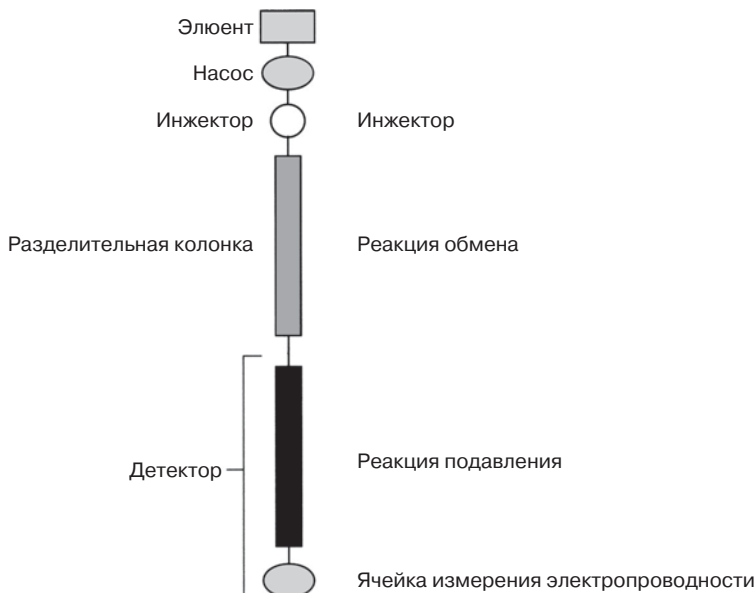


Рис. 6.3. Схематическое представление двухколоночной ионной хроматографии

Задачей подавляющей колонки является, с одной стороны, химическое подавление высокой фоновой проводимости элюента и, с другой стороны, перевод анализируемой пробы в сильнопроводящую форму. Этот вид детектирования также обозначают как «подавленная проводимость».

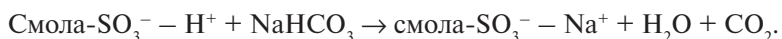
Так как в ионной хроматографии нужно делать принципиальное различие между анализом анионов и анализом катионов, то процессы, которые протекают при химическом подавлении, следует рассмотреть отдельно для каждого из анализов. Решающим для химического подавления является выбор элюента, т.е. вид добавляемых ионов.

АНИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

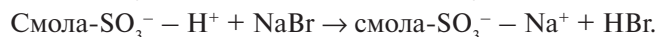
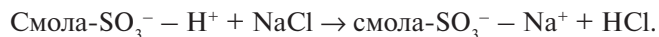
В анализе анионов для химического подавления используется тот факт, что для углекислоты только соль существует в ионной форме, в то время как свободная углекислота существует только в виде двуокиси углерода, растворенной в воде. Элюентам готовят на основе карбонат и/или гидрокарбонат. На аналитической разделительной колонке, содержащей анионообменную смолу в карбонатной форме, в соответствии с ее селективностью разделяются анионы из пробы. Элюирующая сила элюента, содержащего карбонат/гидрокарбонат, определяется соотношением обоих анионов и может варьироваться в широкой области.

После разделения в аналитической колонке создающий электропроводность раствора карбонат или гидрокарбонат превращается в подавляющей колонке в свободную кислоту, т.е. в CO_2 . Одновременно все другие анионы пробы также переходят в форму свободных кислот. Функция подавляющей колонки пояснена на примере разделения таких двух анионов, как хлорид и бромид. После разделения обоих анионов на аналитической анионообменной колонке элюент поступает во вторую колонку, которая содержит сильнокислотный катионообменный сорбент в протонированной форме (H-форма). В этой колонке протекают следующие реакции:

1. Создающий высокую электропроводность гидрокарбонат натрия переводится за счет обмена натриевых ионов на протон катионообменника в недиссоциированную углекислоту. Этот процесс обозначают как подавление проводимости элюента.



2. Хлорид натрия и бромид натрия переводятся в соответствующие им кислоты.



Результат реакции подавления: обладающие высокой проводимостью минеральные кислоты (H^+ -ионы обладают самой большой ионной подвижностью) попадают в детектор по электропроводности в присутствии только слабой проводящей угольной кислоты и могут быть обнаружены с высокой чувствительностью. Эквивалентная проводимость для $\text{H}^+ = 349,8$, а для $\text{Na}^+ = 50,1$. По закону Кольрауша измеряемая проводимость — это сумма обеих эквивалентных проводимостей аниона и катиона. Превращение компонентов пробы в соответствующую

щие минеральные кислоты означает дополнительное повышение чувствительности при кондуктометрической детектировании.

КАТИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

По аналогии с анализом анионов реакция подавления для катионов происходит с HCl в качестве элюента. В этом случае подавительная колонка содержит сильно-основный анионообменник в OH-форме, так что катионы пробы превращаются в гидроксиды, а элюент будет содержать лишь не обладающую проводимостью воду.

Стационарная фаза представляет собой сульфированную по поверхности ионообменную смолу. В качестве элюентов используют, как правило, разбавленную соляную кислоту в концентрациях около 1 ммоль/л, так как хлорид ионы обмениваются при последующем подавлении на OH-ионы и образующаяся при этом вода практически лишена проводимости. На катионообменном сорбенте, находящемся благодаря используемому элюенту в H-форме, другие катионы разделяются в соответствии с его селективностью. При этом, благодаря появлению OH-ионов, снова достигают выигрыша в чувствительности, так как они обладают более высокой эквивалентной проводимостью, чем другие анионы, хотя увеличение чувствительности и не столь высоко, как при появлении H⁺-ионов при анализе анионов.

В этих условиях элюируются ионы щелочных металлов, аммония и простых алкиламинов. Двухзарядные катионы (кальций, магний и переходные металлы) могут не элюироваться разбавленной соляной кислотой, так как обладают крайне высоким сродством к стационарной фазе.

Для разделения щелочноземельных металлов сегодня рекомендуется использовать в качестве элюента раствор м-фенилендиамин дигидрохлорида. Однако он не может храниться очень долго, так как распадается под действием света.

Переходные металлы (железо, медь, никель, цинк, кобальт и свинец) не могут определяться этим способом, хотя их сродство к стационарной фазе сравнимо со сродством кальция и магния. Причина здесь состоит в нерастворимости гидроксидов переходных металлов.

6.2.2.2. Подавитель с мембраной из пустотелого волокна

Система из двух колонок улучшает чувствительность измерения. Тем не менее, она приводит к появлению новых проблем. Как следует из приведенных выше процессов ионного обмена, подавительные колонки должны периодически регенерироваться. При анализе анионов колонку с катионитом переводят снова в H-форму промывкой серной кислотой. Наоборот, подавляющая колонка при анализе катионов регенерируется щелочью. Этот процесс поддается автоматизации, и при работе с двумя подавительными колонками возможен также непрерывный анализ, однако стоимость оборудования соответственно увеличивается.

Простая по сути измерительная система становится более сложной и, вместе с тем, более дорогой; из-за подавительной колонки в хроматографической системе возникает дополнительный мертвый объем, что приводит к уширению пиков всех компонентов. Кроме того, из-за изменения во времени удерживания и отклика детектора при возрастающей нагрузке на подавительную колонку требуется регулярная калибровка системы.

Этот недостаток удалось устранить с развитием подавителя с мембраной из пустотелого волокна (фирма Dionex), который позволяют работу в непрерывном режиме. Подавительное устройство для анионов содержит катионообменную мембрану в форме длинной тонкой трубки. Элюент проходит внутри трубки, а используемая в качестве регенерирующего раствора разбавленная серная кислота протекает по принципу противотока с внешней стороны мембраны. Во избежание обратного перемешивания полая трубка (мембрана) заполняется инертными стеклянными шариками.

Этот подавитель не требует периодической регенерации и, таким образом, не нужно никакой дополнительной системы насосов. Сосуд с регенерирующим раствором устанавливается поверх хроматографа, и раствор подается через регенеративную ячейку только под действием гидростатического давления.

Так как подавитель анионов содержит из катионообменную мембрану, то катионы элюента обмениваются на присутствующие в регенерирующем растворе протоны. Принцип действия пористой мембраны представлен на рис. 6.4. Движущей силой диффузии протонов через мембрану, в целом, является превращение бикарбоната в угольную кислоту. Для сохранения ионного равновесия катионы диффундируют в регенерирующий раствор, чем и поддерживают действие подавителя [6.11].

Поскольку мертвый объем подавителя с мембраной из полого волокна, за счет заполнения внутреннего объема стеклянными шариками, невелик, то это приводит к уменьшению эффектов смешивания разделенных зон и уширения пиков и повышает чувствительность детекторования. Так же устроен и катионный подавитель с мембраной из полого волокна.

Емкость химического подавления у мембран из полого волокна ограничена, поэтому они применяются только в изократическом режиме и с элюентами низкой концентрации. Для улучшения ионного обмена были разработаны микромембранные подаватели. Они содержат плоские ионообменные мембраны, чтобы увеличить площадь, на которой происходит ионный обмен, и при этом не увеличивать очень небольшой мертвый объем подавителя. Преимущество состоит в том, что с этим подавателем детектор по электропроводности может использоваться и при градиентном элюировании. В ионной хроматографии в этом случае приме-

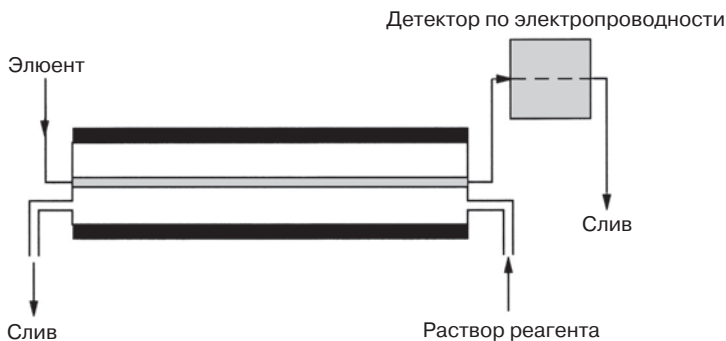


Рис. 6.4. Подавитель на основе полого волокна

няется градиент концентрации соли в элюенте, при котором ионная сила подвижной фазы увеличивается во время хроматографического разделения.

6.2.2.3. Электрохимическое подавление

С 1992 года фирмой Dionex предлагается саморегенирующийся подавитель. Такой авторегенируемый подавитель объединяет преимущества микромембранных подавителей – низкую границу обнаружения и высокую линейность с непрерывным, не требующим обслуживания регенированием [6.12]. Электрохимические подавители регенируются сами, используя воду и электрический ток. Вода берется из элюентов после их прохождения через измерительную ячейку. Внешняя подача кислоты или щелочи для регенирования при этом больше не требуется. Это делает возможным применение колонок с высокой емкостью, что расширяет динамический диапазон и позволяет определять высокие концентрации электролитов.

При прохождении через подавитель элюент, перед входом в детектор, нейтрализуется до слабоионизированной формы. После прохождения детектора по электропроводности элюент используется как регенирующий раствор в блоке подавителя. Электрохимический подавитель конструктивно похож на микромембранный подавитель, однако он дополнительно содержит два электрода для электролиза. При этом в целом можно выделить три реакционные зоны: анодную и катодную области и область внутри ионообменной мембраны. Протекающие в них электролитические и электродиалитические процессы нужно рассматривать отдельно для катионов и анионов.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ПОДАВЛЕНИЕ ДЛЯ АНИОНОВ

Процессы, протекающие при автоподавлении в анализе анионов, представлены на рис. 6.5. В качестве элюента используется раствор гидроксида натрия. При вклю-

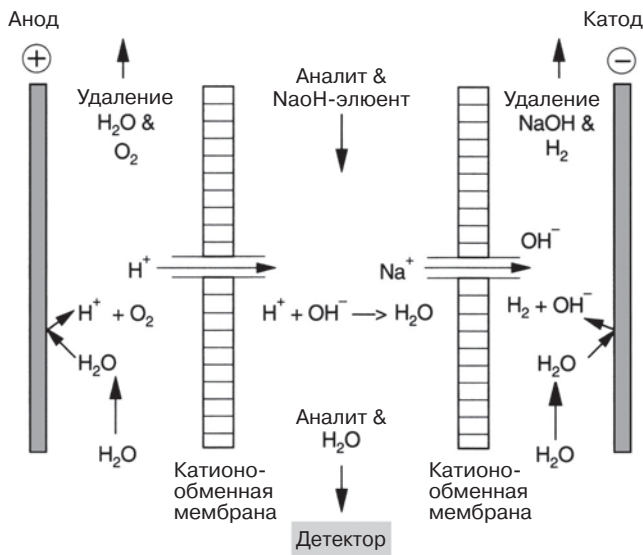


Рис. 6.5. Электрохимическое подавление анионов

чении напряжения происходит электролитическое разложение воды. В процессе электролиза на аноде образуются протоны и кислород, а на катоде — газообразный водород и гидроксид-анионы. Образованные в анодном пространстве протоны мигрируют затем к катионообменной мембране и образуют с ионами элюента — в данном случае, гидроксид-анионами щелочи — воду. Компоненты пробы образуют соответствующую кислоту.

Одновременно в катодное пространство через мембрану мигрируют ионы натрия и образуют с гидроксид-анионами гидроксид натрия в соответствии с принципом электронейтральности. Проникновению гидроксил-анионов в пространство с элюентом препятствует равновесие Доннана на катионообменной мембране, и они поступают на слив в форме NaOH [6.13].

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ПОДАВЛЕНИЕ ДЛЯ КАТИОНОВ

Подавляющие модули при анализе катионов работают аналогично, и отдельные процессы показаны на рис. 6.6. В качестве элюента используют метансульфокислоту (МСК), мембрана представляет собой анионообменник. Вода разлагается электролитически, в катодном пространстве образуются газообразный водород и гидроксид-анионы, в анодном пространстве — газообразный кислород и протоны.

Протоны, образующиеся в анодном пространстве, не поступают в пространство с элюентом вследствие равновесия Доннана. Гидроксид-анионы из катодного пространства мигрируют через анионообменную мембрану и нейтрализуют кислый элюент с образованием воды. Из компонентов пробы при этом образуются соответствующие гидроксиды металлов. Одновременно МСК мигрирует через мембрану в анодное пространство для поддержания электронейтральности. Протоны с анода и метансульфоанионы поступают на слив.

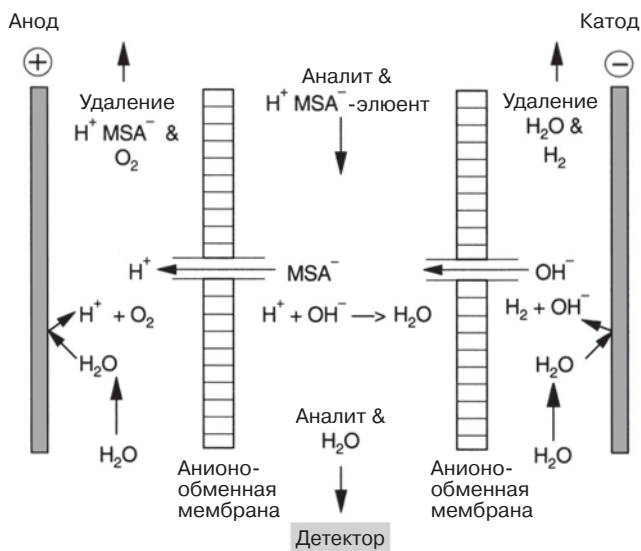


Рис. 6.6. Электрохимическое подавление катионов

6.2.3. Электронное подавление

Сегодня развитие одноколоночной системы (англ.: SCIC, single column ion chromatography), или, лучше сказать, «ионной хроматографии с электронным подавлением проводимости элюента и кондуктометрическим детектированием» является серьезной альтернативой другим методам ИС [6.14]. Всегда существовало желание работать с возможно более простой хроматографической системой, и, кроме того, существовал давний интерес к такой аналитической хроматографической системе, которая, с одной стороны, позволяет успешно проводить разделение ионов без применения подавителя, а, с другой стороны, все еще допускает применение кондуктометрического детектора [6.15]. В этом случае сильно упрощаются тип необходимых компонентов и обслуживание ионных хроматографов. SCIC могут достигать без проблем границ обнаружения 0,1 мг/л при соотношении сигнал/шум 10 : 1. Таким образом, требования к анализу воды могли бы быть в основном выполнены.

По существу решающей отправной точкой развития SCIC явилось наблюдение, что чувствительность измерения определяется различием в эквивалентной проводимости ионов. SCIC с детектором по электропроводности основан, в конечном счете, на выборе в качестве подвижной фазы такого буфера, чья эквивалентная проводимость сильно отличается от проводимости всех ионов пробы [6.16]. С электронной компенсацией фоновой проводимости элюентов можно детектировать повышение или понижение проводимости, вызванного наличием ионов пробы, до 1/100 000 от величины фонового сигнала. Для этого требуется очень хорошее регулирование температуры колонки и детектора, температура которого поддерживается с точностью $\pm 0,001$ °C.

Основное правило для выбора подвижной фазы при SCIC с детектором по электропроводности – это использование буферного раствора, который обеспечивает максимальную разницу проводимостей для ионов пробы и буфера. Так как для ионов пробы можно, как правило, принять среднюю величину эквивалентной проводимости, то универсально используемые буферные растворы обладают либо очень высокой, либо очень низкой проводимостью.

6.2.3.1. Анализ анионов

Для анализа анионов часто используют буферы, содержащие объемные органические кислоты или их соли, которые обладают незначительной эквивалентной проводимостью, или, наоборот, ОН-ионы, которые обладают, соответственно, высокой эквивалентной проводимостью. С 1979 года анионообменники в одноколоночных системах с кондуктометрическим детектированием применяют анионообменные сорбенты низкой емкости и элюенты с низкой проводимостью, как, например, 10^{-4} молярные растворы солей п-гидроксibenзойной или фталевой кислоты. На использованных в этом методе модифицированных ионитах можно получать быстрые разделения как неорганических, так и органических анионов. Частичная нейтрализация элюентов (до величины рН от 4 до 6) необходима, чтобы уменьшить концентрацию протонов и гидроксид-анионов с их высокими эквивалентными проводимостями. Тем не менее, значительная проводимость фо-

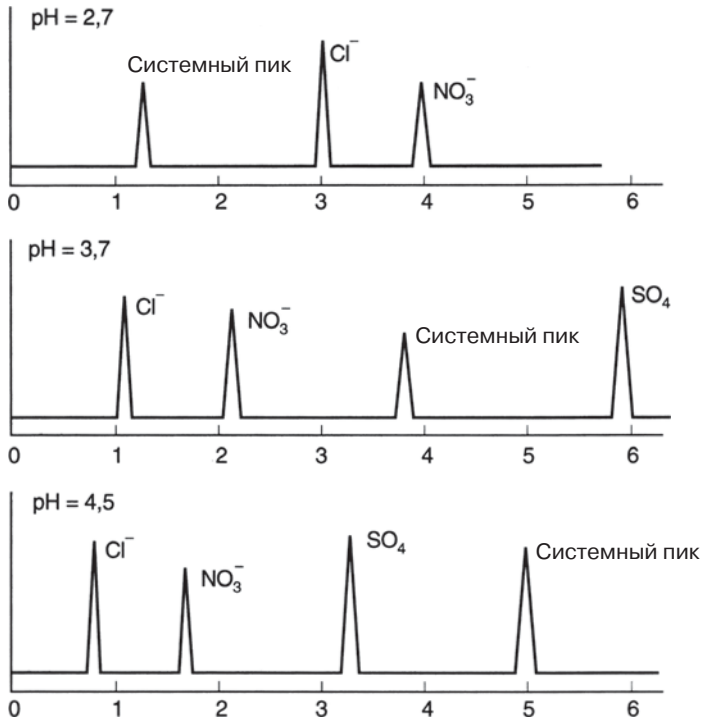


Рис. 6.7. Влияние рН при использовании фталевого буфера в качестве элюента

нового раствора с величинами между 75 и 200 мкСм/см ограничивает пределы обнаружения и линейный динамический диапазон детектора.

Для эффективной оптимизации разделения анионов в SCIC необходимо знание последовательности элюирования и параметра, определяющего скорость разделения. В общем элюирующая сила ионов буфера непосредственно зависит от его сродства к ионообменнику. Более того, сродство возрастает от моно- и двухвалентных к трехвалентным ионам. Это привносит значительное разнообразие в процесс оптимизации SCIC. Если в качестве буфера выбирают двух- или трехосновную слабую кислоту с различной величиной рКа для каждой ступени диссоциации, то относительной концентрацией одновалентных (слабо) и двухвалентных (сильно) ионов в элюенте можно управлять изменяя величину рН.

Разумеется, не все величины рН подходят одинаково хорошо для конкретного разделения. Из-за «системного пика», который является характерным для поглощения или десорбции нейтральной фталевой кислоты при вводе пробы, фталевый буфер используют в одноклоночной хроматографии преимущественно при трех величинах рН. Влияние рН на элюцию представлено на рис. 6.7.

рН 2,7

При этой величине рН раствора фталевой кислоты системный пик появляется в начале хроматограммы. Так как в буфере присутствуют только одновалентные ионы, то раствор фталевой кислоты – это лишь слабый элюент. Фосфат, хлорид

или нитрат разделяются превосходно, сульфат, разумеется, остается необратимо связанным.

pH 3,7

С этим фталатным буфером достигают хороших результатов разделения для большинства неорганических анионов, причем системный пик лежит, в общем случае, между пиками нитрата и сульфата.

pH 4,5

При этой величине pH фталатный буфер обладает наибольшей элюирующей силой, системный пик появляется после сульфата.

Часто анализ неорганических кислот осложняется присутствием органических кислот, как, например, в продуктах первой необходимости, таких как пища, напитки, растительные экстракты и т.д. Возможность применения SCIC также при низких величинах pH уменьшает ошибки измерения. В области pH 2,7 эти слабые органические кислоты элюируются из ионообменной колонки очень быстро и не мешают измерению интересующих неорганических анионов.

Хотя в качестве подвижной фазы часто используют буферные растворы двухосновных кислот, одновалентные кислоты также полезны при разделении и позволяют реализовать очень интересные приложения. Так, анионы, обладающие лишь незначительным удерживанием на данной стационарной фазе, отлично разделяются при использовании в качестве подвижной фазы буфера на основе никотиновой кислоты. Низкая эквивалентная проводимость, с одной стороны, и сравнительно высокая полярность, с другой стороны, обуславливают ее хорошую растворимость в воде и незначительную сорбцию на неполярных колонках.

6.2.3.2. Анализ катионов

По той же схеме, используя комбинацию ионита низкой емкости с элюентами низкой проводимости, возможно разделение ионов щелочных и щелочно-земельных металлов. Самое частое приложение SCIC при анализе одновалентных катионов — это разделение на катионообменном сорбенте на основе полистирола с использованием азотной кислотой (1–10 мМ) в качестве подвижной фазы. Так как H-ионы обнаруживают более высокую эквивалентную проводимость, чем, к примеру, ионы натрия или аммония, пики пробы в такой системе инвертируются, т.е. электрическая проводимость падает, когда ионы пробы элюируются с колонки. Для того чтобы получить положительный пик, который необходим при количественной оценке с использованием обычных интеграторов, надо просто поменять полярность у интегратора.

Все вышесказанное о силе элюирования буферных растворов касается равным образом анализов анионов и катионов. В общем случае, двухзарядные ионы пробы задерживаются слишком сильно, чтобы вымываться из колонки элюентом на основе однозарядных ионов, например, протона. Поэтому двухзарядные катионы определяются, как правило, с использованием элюентов на основе двухзарядных ионов, обладающих высокой эквивалентной проводимостью, например, этилендиамина.

Если применяются кислые или основные ионообменные сорбенты с более высокой емкостью, то нужно использовать более крепкие элюенты, такие как 0,1 М соляная кислота или щелочь. Для таких систем, использующих преимущественно классические элюенты, в ряде случаев, даже при добавлении в элюент органических растворителей, как, например, ацетона, детектирование катионов в онлайн-режиме возможно только после реакции в постколоночном реакторе с комплексообразующими реагентами, например, пиридилрезорцином, позволяющими фотометрическое определение.

6.2.4. Концентрирование пробы в ИХ

В системах, использующих чистую воду, таких как устройства для водоподготовки и системы водоохлаждения, требуются крайне низкие пределы обнаружения ионов. Анализы в области от нескольких ppb до ppt уровня возможны только после трудоемкой и плохо воспроизводимой концентрации проб. При этом большие количества пробы концентрируются на концентрирующей колонке и переносятся затем на аналитическую разделительную колонку.

Коммерческие концентраторы проб могут быть встроены в существующие системы для ИХ. Рис. 6.8 показывает принцип техники предконцентрирования.

Концентратор состоит из ЖХ-насоса (5) для подачи пробы и из автоматического шестиходового переключающего крана (4), соединенного с концентрирующей колонкой (3), заполненной ионообменным сорбентом. Проба (8) автоматически подается на концентрирующую колонку, на которой происходит концентрирование анионов. После этого переключающий кран полностью автоматически переводится во второе положение, и концентрирующая колонка соединяется с системой ИХ. Элюент (1) проходит теперь через концентрирующую колонку и переносит анионы на хроматографическую колонку (6) системы для ИХ для последующего анализа, где они разделяются и детектируются (7). (2) — это насос для ИХ.

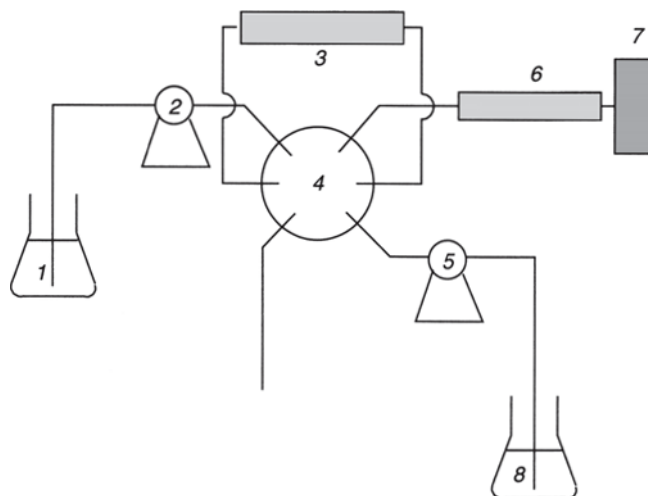


Рис. 6.8. Схематическое изображение метода предконцентрирования

6.3. Разделение переходных металлов

Для анализа переходных и тяжелых металлов метод ионной хроматографии все в большей степени оказывается альтернативой и дополнением к обычным методам, таким как метод атомной спектроскопии. Широкое применение ионообменных процессов для определения тяжелых металлов обусловлено тем, что множество других неорганических и органических ионов могут анализироваться на тех же приборах. По сравнению с атомной спектроскопией ионная хроматография обладает тем преимуществом, что может отличать различные степени окисления металлов, причем они могут анализироваться не только в свободном, гидратированном состоянии, но и в комплексно-связанной форме.

Химия переходных и тяжелых металлов характеризуется тем, что они могут существовать в большинстве случаев в нескольких формах, причем в более высоких степенях окисления они существуют, обычно, в виде кислородсодержащих анионов. Поэтому по сравнению с одновалентными щелочными металлами нужно применять особую технику разделения. При этом не всегда применимо кондуктометрическое детектирование, и в этих случаях используется прямое или косвенное УФ-детектирование в сочетании с постхроматографической дериватизацией.

6.3.1. Кислородсодержащие анионы переходных металлов

Металлы VI побочной подгруппы периодической системы, такие как хром и молибден, а также металлы VII побочной подгруппы, марганец и рений, в высоких степенях окисления существуют как анионные оксокомплексы. Поэтому хромат, молибдат и соли марганцевой кислоты могут разделяться как кислородсодержащие анионы на анионообменниках. Как элюент применяется, например, буфер карбонат натрия/бикарбонат натрия, детектируют, как правило, электрическую проводимость. Так как ионы этого типа из-за большого радиуса обладают пониженным сродством к стационарной фазе, то наряду с натрий карбонатом и натрий бикарбонатом для приготовления буфера можно использовать п-цианофенол, чтобы минимизировать адсорбцию.

6.3.2. Комплексы переходных металлов

Важный метод определения переходных и тяжелых металлов заключается в хроматографическом разделении их комплексов и количественном определении последних по электропроводности. Для хроматографического разделения в первую очередь подходят анионные комплексы, которые должны обладать термодинамической и кинетической стабильностью. Это значит, что образование соответствующего комплекса должно быть термодинамически возможным и, более того, необратимым процессом. Для этого в качестве комплексообразователя подходит этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТУ). С помощью ионной хроматографии разделяют также хлоро- и цианокомплексы металлов.

ЭДТУ образует достаточно прочные комплексы со многими переходными металлами, чтобы было возможным их разделение ионообменной хроматографией. Детектирование проводят по измерению электропроводности.

Благородные металлы, золото, палладий и платина, могут разделяться на анионообменных сорбентах в виде комплексов с хлориданионом. В качестве подвижной фазы служит смесь соляной кислоты и перхлората натрия. Изменяя количество добавленного перхлората, можно влиять на времена удерживания. Так как хлорокомплексы поглощают свет в УФ области, то можно использовать ультрафиолетовый детектор, что позволяет достичь границы обнаружения вплоть до нижней ррт области.

Особенно в области гальванотехники интерес представляет ИХ анализ цианидных комплексов металлов. Это интересно потому, что через комплексообразование с цианид-ионом можно определить степень окисления соответствующего металла. Например, оба гексацианоферрата $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ и $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{2-}$ элюируются в порядке, соответствующем возрастанию заряда. Для золота эти соотношения выглядят иначе. В большинстве ванн, служащих для извлечения золота, золото существует в форме цианокомплексов как одновалентного, так и трехвалентного золота. Комплексы одно- и трехвалентного золота $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ и $[\text{Au}(\text{CN})_4]^-$ обладают одинаковым электрическим зарядом. Разделение обоих комплексов происходит при этом на основе разного координационного числа и таким образом разного пространственного строения обоих комплексов.

В противоположность цианокомплексам железа, кобальта и золота, которые обладают высокой стабильностью и существуют поэтому как индивидуальные анионы, цианокомплексы никеля, меди и серебра при хроматографическом разделении не полностью индивидуальны. Ответственны за это низкие константы образования этих комплексов, что приводит к некоторой диссоциации комплекса на ион металла и лиганд. Тем не менее, при добавлении небольшого количества KCN к подвижной фазе такое равновесие может быть сдвинуто в сторону комплекса, и он, таким образом, может успешно хроматографироваться.

6.4. Ионная эксклюзионная хроматография

Ион-эксклюзионная хроматография (англ.: Ion size exclusion chromatography) служит для разделения слабых органических кислот. Типичное применение – это определение различных фруктовых кислот в соках и продуктах. Сильная неорганическая минеральная кислота не удерживается на стационарной фазе и элюируется полностью за мертвое время. Ион-эксклюзионные колонки содержат полностью сульфатированный катионит высокой емкости. Сульфогруппы частично гидратированы водными молекулами. При этом образуется частично отрицательно заряженная мембрана, так называемая доннановская мембрана, которая проницаема только для недиссоциированных молекул [6.17]. Полностью диссоциированная неорганическая минеральная кислота, такая как действующая в качестве элюента соляная кислота, из-за отрицательного заряда хлорид-ионов не может преодолеть мембрану. Напротив, молекулы воды могут беспрепятственно проникать в поры смолы и диффундировать назад в подвижную фазу, как показано на рис. 6.9.

Органические карбоксикислоты, у которых из-за низкой величины рН элюентов диссоциация затруднена, могут проникать сквозь доннановскую мембрану в недиссоциированной форме и адсорбироваться на ионите.

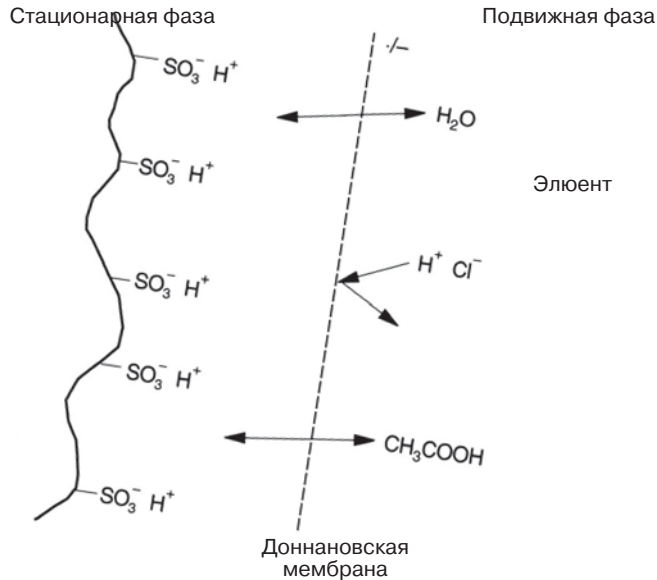


Рис. 6.9. Схема ионной эксклюзионной хроматографии

Механизм разделения обусловлен доннановым исключением и адсорбцией. Чем ниже величина рН, тем меньше диссоциация карбоновой кислоты и тем больше молекул кислоты может попасть в стационарную фазу. Временем удерживания и, вместе с тем, оптимизацией хроматограмм можно управлять изменением величины рН подвижной фазы. С другой стороны, удерживание алифатических карбоновых кислот можно ослабить добавлением ацетонитрила к подвижной фазе, так как ацетонитрил блокирует сорбционные центры [6.18].

Доминирующий механизм при разделении ди- и трикарбоновых кислот, таких как лимонная, шавелевая и т.д., — это стерическое исключение наряду с исключением Доннана. При этом удерживание зависит от величины молекулы. В основном оптимизация разделения органических кислот возможна с изменением величины рН элюентов, так как степень ионизации и, тем самым, время удерживания определяются величиной рН элюента. Детектирование осуществляется благодаря непосредственному УФ поглощению или по электропроводности в сочетании со специальным подавительным модулем для ион-эксклюзионной хроматографии.

Со специальными колонками с помощью ион-эксклюзионной хроматографии возможно также разделение белков по молекулярному весу. В широкой области рН белки с молекулярной массой от 2000 до 1 000 000 Дальтон могут разделяться быстро и воспроизводимо. Напротив, в обращеннофазовой хроматографии, хотя разделение происходит также и здесь, белки денатурируются органическими элюентами, поэтому затем можно проводить только лишь аминокислотный анализ и анализ аминокислотной последовательности. Кроме того, может происходить и необратимая адсорбция белка на сорбенте [6.19].

Недостатки обращеннофазовой хроматографии можно устранить, если использовать хроматографию гидрофобного взаимодействия. При этом водная обо-

лочка вокруг молекулы белка удаляется добавлением к элюенту высоких концентраций соли, в большинстве случаев, от 1 до 2 М растворов сульфата аммония. Гидрофобные области освобождаются, вследствие чего становится возможно взаимодействие белка с гидрофобным носителем. Эти «гидрофобные взаимодействия» снова избирательно устраняются при уменьшении концентрации соли, так как гидратная оболочка вокруг молекулы белка восстанавливается. Если задать градиент элюента с уменьшением концентрации соли, то белки элюируются согласно возрастающей гидрофобности. Тем самым становится возможным избирательно разделять белки с градиентом буфера и без использования органических растворителей [6.20].

6.5. Возможности детектирования

В принципе все известные в ВЭЖХ детекторы могут применяться в ионной хроматографии [6.21]. Наряду с универсально применимым кондуктометрическим детектором [6.22] интерес представляют, прежде всего, более специфический и иногда более чувствительный амперометрический детектор или УФ детектор [6.23]. Самый важный детектор в ионной хроматографии — это детектор по электропроводности, качество которого характеризуется стабильностью его базовой линии и развитию которого сильно содействовала ионная хроматография.

6.5.1. Детектор по электропроводности

Электропроводность предназначена для того, чтобы определять ионы в водном растворе. Этот тип детектора применяется как при химическом, так и при электронном подавлении проводимости элюентов. Принцип действия в течение последних лет совершенствовался специально для ионной хроматографии. Критериями качества детектора по электропроводности являются линейный диапазон, разрешение, фоновый шум и температурная компенсация.

6.5.1.1. Линейность

В обычных измерительных ячейках к электродам прикладывается переменное синусоидальное напряжение. Из-за образования вблизи электродов электрически заряженного двойного слоя наряду с омическим сопротивлением дополнительно возникает емкостное сопротивление, которое вызывает сдвиг по фазе приложенного синусоидального напряжения. С аналоговыми детекторами невозможно измерить чисто омическое сопротивление. Это ведет к нелинейности при переключении областей измерения.

Эту проблему можно решить внедрением «биполярной импульсной техники». Из приведенного на рис. 6.10 для такого импульса профиля зависимости тока от времени видно, что выходной сигнал деформируется при зарядке и разрядке емкости, возникающей из-за наличия двойного слоя. Измерение омического сопротивления происходит цифровым образом в тот момент времени, когда емкость заряжена. Отрицательная часть импульса служит только для того, чтобы за счет переплюсовки освободить электроды от образующегося ионного облака. Этот

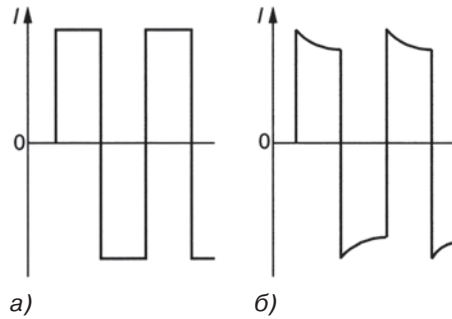


Рис. 6.10. Профиль зависимости тока от времени для биполярного импульса: а) входной сигнал, б) выходной сигнал

метод измерения исключает нелинейность при переключениях областей измерения.

6.5.1.2. Разрешение

Чувствительность измерения значительно увеличивается при внедрении микропроцессорной техники. Чтобы микропроцессор можно было использовать при обработке данных, аналоговые величины напряжения должны быть предварительно оцифрованы. С внедрением микропроцессорной техники в детектор по электропроводности становится возможным определять ионы в средней и нижней областях ррВ концентраций без предварительного концентрирования.

6.5.1.3. Фоновый шум

Ввиду повышения чувствительности новых типов детекторов по электропроводности особые усилия прилагались к тому, чтобы уменьшить их фоновый шум. Измеренный сигнал оцифровывается в аналого-цифровом преобразователе. На рис. 6.11 представлен входной сигнал АЦП, который перекрывается значительным шумом. При измерении в каждой точке сигнал подается на АЦП с постоянной тактовой частотой. Вызванные этим колебания измеряемых сигналов являются причиной шума и сглаживаются с помощью электронного подавителя шума.

Существенно улучшенное подавление шума получают с помощью «встроенных» АЦП. Преобразователь этого типа измеряет входной сигнал во временных интервалах Δt и рассчитывает площадь сигнала. После деления на времена Δt получают искомую усредненную величину сигнала.

При химическом подавлении проводимости элюентов приходится измерять существенно более низкие проводимости, чем при электронном подавлении. Поэтому шум становится выше, и для измерения нужен особо чувствительный прибор с большим отношением сигнал/шум. Дальнейшего уменьшения фонового шума достигают цифровым преобразованием отклонения от базовой линии. Во всех аналоговых детекторах с помощью напряжения смещения базовая линия устанавливается на желаемой позиции. Тем не менее, это напряжение непостоянно и, таким образом, дает определенный шум. В современных детекторах по электропроводности, наоборот, величина отклонения регистрируется микропроцес-

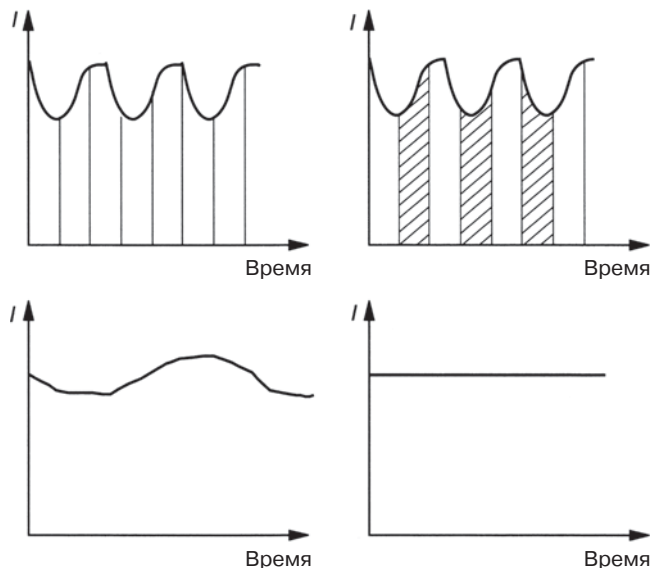


Рис. 6.11. Сравнение подавления шума. Слева: дискретное измерение; справа: интегральное измерение

сorum, сохраняется в цифровом виде и с момента ввода непрерывно вычитается из измеряемой величины. Полученная величина — это константа, которая не изменяется вплоть до ввода новой величины смещения.

6.5.1.4. Температурная компенсация

Так как проводимость раствора электролита зависит от температуры, нужно принять меры, чтобы соответствующим образом скорректировать влияние температуры. Для наибольшего числа ионов эквивалентная проводимость изменяется примерно на 1,7% с изменением температуры на 1 °С. Это влияние температуры можно устранить двумя инструментальными способами:

- термостатированием измерительной ячейки и
- электронной компенсацией градиента температуры.

Детекторный блок обычно термостатируется выше комнатной температуры примерно от 25 до 40 °С, и, соответственно, элюент также нагревается в детекторном блоке. Температура регулируется с точностью до 0,01 °С. При внедрении детекторов по электропроводности, управляемых микропроцессором, можно отказаться от дорогостоящего термостатирования измерительной ячейки и проводить температурную компенсацию электронно. При этом температурный коэффициент, который составляет, как правило, 1,7% на градус изменения температуры, может дополнительно регулироваться. Электронная температурная компенсация предполагает знание фактической температуры элюента, проходящего через измерительную ячейку. Поэтому в измерительную ячейку интегрирован термистор. По данным о величине температурного коэффициента и температуры элюента микропроцессор рассчитывает фактическую проводимость.

6.5.1.5. Использование детектора проводимости в одноколоночной системе

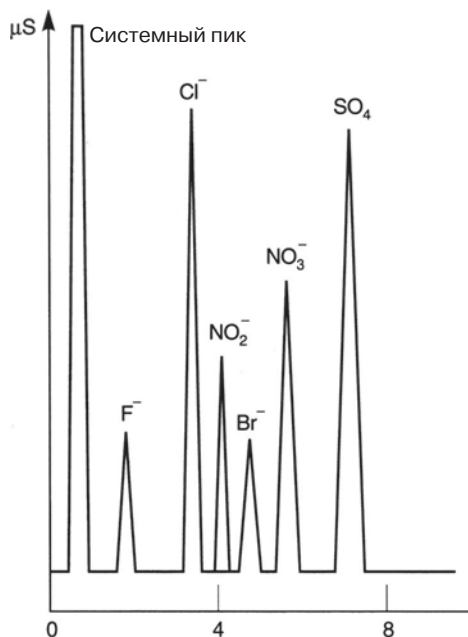
При хроматографии ионов с непосредственным детектированием проводимости в большинстве случаев в качестве элюентов применяются ароматические карбоксикислоты: фталевая, бензойная или салициловая кислоты в миллимолярных концентрациях. Так как эквивалентная ионная проводимость у большинства неорганических анионов примерно вдвое больше, чем у анионов элюента, то наблюдается положительное изменение проводимости, которое пропорционально введенному количеству пробы. Линейный рабочий диапазон при объеме пробы 100 мкл составляет примерно от 0,05 до 100 мг/л. Нижняя граница определена качеством детектора и насоса и величиной фонового сигнала, верхняя граница обусловлена емкостью колонки.

При разделении катионов с помощью кондуктометрического детектора наблюдаются, в основном, отрицательные изменения проводимости, так как катионы элюента имеют эквивалентную проводимость в пять – десять раз выше, чем катионы пробы. Однако хроматограмму изображают привычным способом, т.е. пики ориентированы вверх за счет того, что соответствующим образом меняют полярность выходного сигнала детектора (рис. 6.12).

6.5.2. Амперометрический детектор

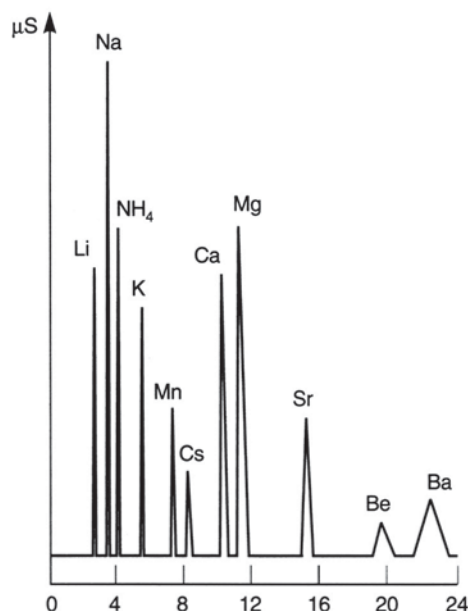
Амперометрический детектор селективен к веществам, которые можно окислять или восстанавливать электрохимически. У этих детекторов используют трехэлектродную измерительную ячейку, которая состоит из рабочего электрода, вспомогательного электрода и электрода сравнения. В качестве рабочего электрода, как правило, используют стеклоуглеродный электрод (англ.: glassy carbon). Между рабочим электродом и электродом сравнения с помощью потенциостата устанавливается потенциал, необходимый для реакции окисления или восстановления. Если электрохимически активное вещество проходит через ячейку, его частично окисляют или восстанавливают. При этом возникает анодный или катодный ток, который в определенных пределах пропорционален концентрации этого вещества и поэтому может быть представлен в качестве хроматографического сигнала [6.24].

В общем амперометрическая детекция применяется для соединений, которые из-за своей незначительной диссоциации плохо детектируются по проводимости. Однако число электрохимически определяемых веществ очевидно ограничено, так как область прикладываемого потенциала ограничена максимально до +1,2 В [6.25]. Детекторы этого вида применяются для определения ряда неорганических и органических ионов в комплексных матрицах, например, в биологических пробах, вплоть до области ppb концентраций. Примерами определяемых неорганических анионов являются хлорид, бромид, йодид, сульфид, тиоцианат, цианид, цианат. При использовании слабокислых или нейтральных элюентов нужно обращать внимание на то, чтобы они сами не окислялись при рабочих потенциалах вплоть до +1,2 В. Линейный рабочий диапазон лежит в области мкг/л и по массе может определяться примерно от 0,1 до 100 нг [6.26].



Элюент: фталевая кислота 2,5 ммоль/л
Поток: 1,5 мл/мин
Объем пробы: 100 мкл

Время удерживания, мин	Ион	мг/л
1,8	F	10
3,3	Cl	50
4,1	NO ₂	10
4,9	Br	10
5,7	NO ₃	50
7,2	SO ₄	100



Элюент: лимонная кислота 5 ммоль/л,
дипиколиновая кислота 0,4 ммоль/л
Поток: 1,0 мл/мин
Объем пробы: 10 мкл

Время удерживания, мин	Ион	мг/л
2,8	Li	1
3,6	Na	5
4,2	NH ₄	5
5,6	K	10
7,4	Mn	5
8,3	Cs	10
10,3	Ca	10
11,6	Mg	10
15,2	Sr	20
19,9	Be	1
22,4	Ba	20

Рис. 6.12. Пример разделения анионов и катионов

Поскольку исследуемая проба соприкасается с поверхностью электродов, электрод может загрязняться продуктами окисления или восстановления. Вследствие этого изменяется поверхность электрода, что влечет за собой уменьшение чувствительности и дрейф нулевой линии. Такие соединения, как углеводы и спирты

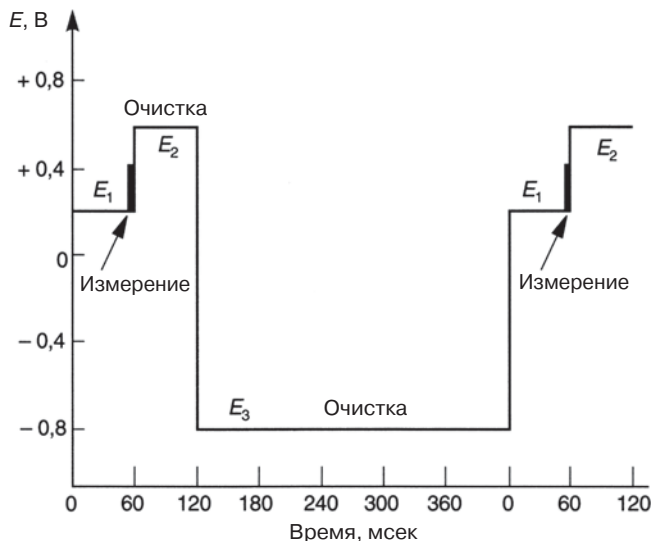


Рис. 6.13. Типичная последовательность потенциалов импульсного амперометрического детектора

дают при амперометрическом детектировании продукты окисления, которые так быстро отравляют электрод, что для их определения не могут использоваться амперометрические детекторы с фиксированным рабочим потенциалом.

Чтобы амперометрически детектировать углеводы и спирты, был разработан импульсный амперометрический детектор, который может последовательно прикладывать до трех различных потенциалов между рабочим электродом и электродом сравнения [6.27]. Функциональный принцип импульсного амперометрического детектора представлен на рис. 6.13. В отличие от обычных детекторов, ток измеряется только в коротких временных интервалах. Окисляемые и восстанавливаемые продукты реакции могут удаляться с поверхности электродов повышением положительного и понижением отрицательного потенциалов [6.28].

Наряду с используемым в большинстве случаев стекло-углеродным электродом применяются также электроды из других материалов. Загрязнители окружающей среды, цианид и сульфид, можно очень чувствительно определять с помощью серебряного рабочего электрода. Для определения гипохлорита, гипофосфита, гидразина или фенола применяют платиновый рабочий электрод. Во многих случаях можно использовать систему, состоящую из амперометрического детектора и детектора проводимости, чтобы достичь одновременного детектирования электрохимически активных и неактивных соединений. Интересным является применение импульсного амперометрического детектора для определения углеводов, которые можно разделять на анионообменной колонке [6.29].

6.5.3. УФ детектирование

УФ детектирование в ионной хроматографии, в отличие от ВЭЖХ, играет лишь второстепенную роль, но может восприниматься как ценное дополнение к ос-

тальным методам детектирования [6.30]. Лишь относительно немногие неорганические анионы поглощают в ультрафиолете, что позволяет избирательно определять их по поглощению света. Примерами являются определение бромидов и йодидов в морской воде, а также нитрита в присутствии высоких концентраций хлорид-аниона. Этот метод определения нитрита используется, например, при анализе слюны человека и вытяжек из солонины. Линейный рабочий диапазон соответствует рабочему диапазону детектора по электропроводности, но иногда, в зависимости от коэффициента экстинкции, могут быть значительно снижены пределы обнаружения [6.31].

Для прямой УФ-детекции в области длин волн от 200 до 230 нм можно использовать только те элюенты, которые сами не поглощают в ультрафиолете. Обычные элюенты, используемые при работе с детектированием по электропроводности, для этого не подходят, так как входящие в их состав ароматические карбоксикислоты сильно поглощают в этой области длин волн. Здесь находят применение элюенты с неорганическими анионами: перхлоратом, фосфатом, боратом и сульфатом. К сожалению, эти элюенты не подходят для прямого детектирования по электропроводности, так как различия в ионной эквивалентной проводимости при этом слишком незначительны [6.32].

6.5.3.1. Постколоночная дериватизация

Важным примером использования УФ-детектирования является определение переходных металлов после постколоночной дериватизации с помощью 4-(2-пиридилазо)резорцина (ПАР). Ионы металлов, разделенные в виде оксалат-цитратных комплексов на ионообменной колонке, направляются с этой целью в «постколоночный реактор».

ПАР-реагент, который со многими тяжелыми металлами образует сильно окрашенные хелатные комплексы, которые можно детектировать в видимой области спектра при 520 нм, через тройник подмешивают к элюенту. Превращение происходит в реакционной петле, которая заполнена инертными стеклянными шариками, чтобы, с одной стороны, уменьшить уширение зон, а, с другой стороны, достичь оптимального перемешивания. Устройство постколоночного реактора показано на рис. 6.14.

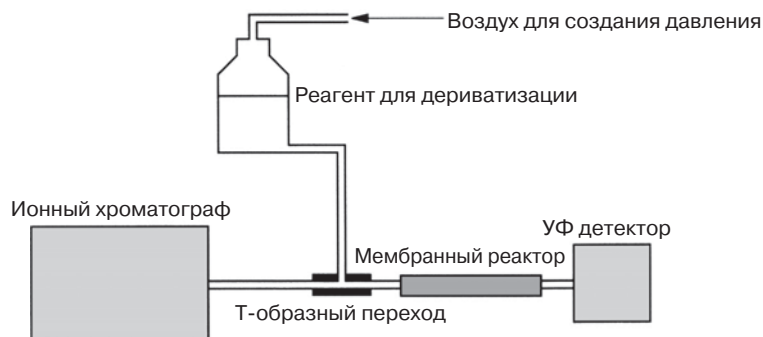


Рис. 6.14. Схема устройства постколоночной дериватизации

Подачу реагентов можно значительно улучшить с помощью мембранного реактора. Мембранный реактор применяется в сочетании с резервной емкостью для реагента и содержит полупроницаемую мембрану, которая проницаема для ПАВ. Реагент под давлением равномерно поступает в мембранный реактор и диффундирует там во внутреннюю часть мембраны, где происходит перемешивание элюентом из колонки. Благодаря такому виду подачи реагента значительно уменьшается низкочастотный шум при последующем фотометрическом детектировании. Так как при этом также уменьшается объем введенного реагента, то при этом удастся минимизировать эффекты разбавления. Оптимизация обоих параметров приводит, таким образом, к заметному повышению чувствительности определения.

Разделение катионов переходных металлов требует превращения ионов металлов в подвижной фазе в комплексы, чтобы уменьшить их эффективную плотность заряда. Моновалентные катионы, Na^+ или H^+ , не подходят для элюирования. Так как коэффициенты селективности у ионов переходных металлов, имеющих одинаковый заряд, почти не отличаются, то изменение селективности у этих ионов возможно только с помощью образования нейтральных или анионных комплексов с подходящими комплексообразователями. К ним относятся слабые органические кислоты: лимонная, щавелевая, винная и т.д.

Рис. 6.15 показывает равновесия, которые устанавливаются при разделении переходных и тяжелых металлов. Из рисунка видно, что в разделении ионов переходных металлов с помощью комплексообразования в подвижной фазе могут участвовать как катионообменные, так и анионообменные процессы.

Если соответствующий ион металла существует в гидратированной форме, то разделение можно проводить на катионообменнике. С другой стороны, разделение кинетически более стабильных анионных комплексов металлов возможно на анионообменнике. Следовательно, комплексы металлов с низкой константой образования разделяются преимущественно с помощью катионного обмена, а комплексы металлов с высокой константой образования – в ходе анионного обмена. Поэтому для этого метода разделения разработали колонки со смешанной анионо- и катионообменной емкостью. На таком смешанном ионообменном сорбенте могут разделяться, например, различные соли хромовой кислоты, причем соединения Cr (III) разделяются как катионы, а соединения Cr (VI) – как анионы.

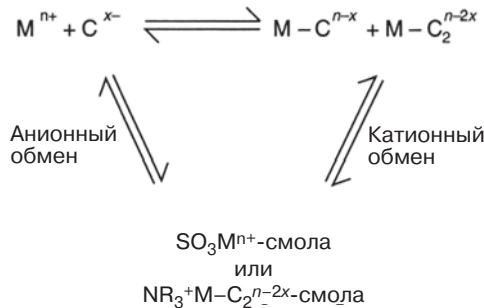


Рис. 6.15. Иллюстрация равновесия, возникающего при разделении переходных и тяжелых металлов

Постколоночная дериватизация в сочетании с УФ детектированием была предложена также для определения алюминия и поливалентных анионов. Поливалентные анионы, такие как полифосфаты, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТУ) и нитрилотриуксусная кислота, элюируются разбавленной азотной кислотой. Постколоночная дериватизация годится и для нитрата железа, причем образующиеся комплексы железа детектируются при 330 нм. Примеры этого типа разделений показывают, что комбинирование УФ детектирования и постколоночной дериватизации — это существенная составная часть современной ионной хроматографии.

6.5.3.2. Косвенная УФ детекция

Если ультрафиолетовый детектор используется в ВЭЖХ, то применяют подвижную фазу, которая обладает по возможности более низким собственным поглощением при длине волны, используемой для детектирования соединений. Напротив, определяемый компонент должен обладать как можно более высоким поглощением. При косвенном УФ детектировании на первое место ставят условия классической абсорбционной спектрофотометрии [6.33]. Здесь используют подвижную фазу с возможно более высоким поглощением. Принцип этого метода представлен на рис. 6.16. Переполюсовка на выходе детектора снова позволяет наблюдать положительные пики. Хроматография с косвенной фотометрией — это простой и чувствительный метод детектирования большого числа слабо поглощающих в ультрафиолете анионов и катионов.

Данные о спектре поглощения помогают при выборе подходящих для детектирования длин волн. Подходящая область компенсации лежит между 0,7 и 1,0 единиц поглощения. В качестве подвижной фазы чаще всего используют раствор бифталата калия в концентрации 10^{-4} – 10^{-3} М. Так выбор концентрации играет важную роль при хроматографическом разделении, то для каждой выбранной кон-

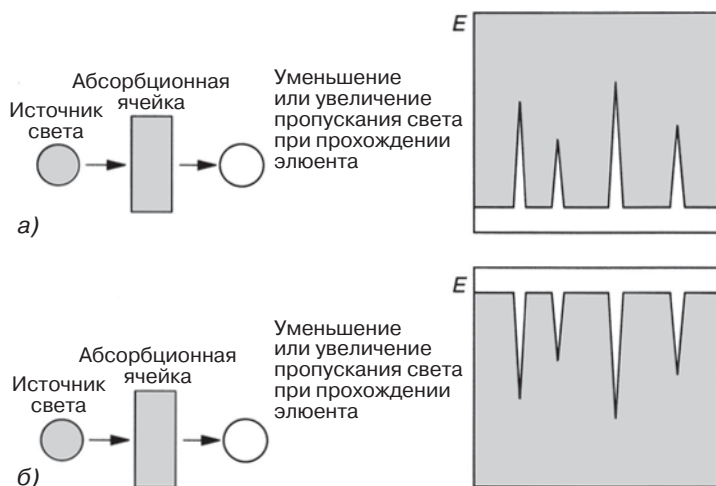


Рис. 6.16. Объяснение обычного и косвенного УФ детектирования: а) обычное УФ детектирование; б) косвенное УФ детектирование

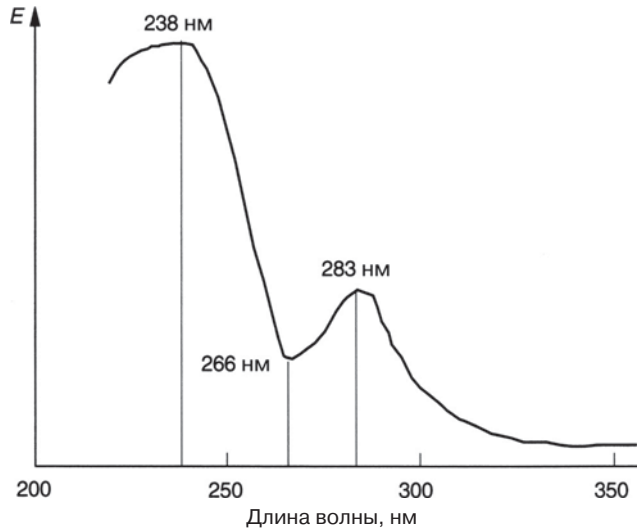


Рис. 6.17. УФ спектр бифталата калия

центрации фталата можно найти наиболее подходящую длину волн для детектирования [6.34]. Рис. 6.17 показывает спектр поглощения бифталата калия.

С помощью постколоночной дериватизации можно использовать также высокочувствительный флуоресцентный детектор. Например, для определения аминокислот в элюент примешивают ортофталевый диальдегид, который образует с аминокислотами комплексы с интенсивной синей флуоресценцией.

6.5.3.3. Комбинирование ионной хроматографии с оптической эмиссионной спектрометрией и масс-спектрометрией с индукционно-связанной плазмой

Ионная хроматография – это аналитический метод разделения, которым можно определять также соответственно валентность отдельных ионов металла. Оптическая эмиссионная спектрометрия и масс-спектрометрия с индукционно-связанной плазмой (ИСП-ОЭС и ИСП-МС) – это эффективные методы для одновременного определения многих элементов, которые, однако, не позволяют определять их валентность. Комбинирование ионной хроматографии с одним из этих методов позволяет объединить преимущества обоих методов и достичь высокой чувствительности элементного анализа.

Вопрос о валентном состоянии элементов будет занимать нас все больше, так как существуют микроэлементы, которые необходимы в одном валентном состоянии, но высокотоксичны в другом. Примером тому является хром, который проявляет токсичность в шестивалентной форме, но в трехвалентной форме, наоборот, необходим, так как участвует в обмене веществ. Определение валентности можно провести с помощью одной ионной хроматографии, но метод дорого стоит и требует тщательного согласования всех этапов анализа. Комбинирование с атомной спектрометрией предполагает использование дорогих детекторов, но дает возможность в дальнейшем проводить анализы быстро и просто [6.35].

ИСП-МС принадлежит к самым эффективным методам мультиэлементного анализа в области следовых количеств. Этот метод отличается экспрессностью и низкой чувствительностью к влиянию матрицы, причем более 75 элементов периодической системы могут определяться с почти одинаковой чувствительностью вплоть до области суб-нг/г. Если этот метод комбинируют с ионной хроматографией, то разделенные ионные компоненты попадают в масс-селективный детектор в разное время согласно времени их удерживания на колонке. Чувствительность мультиэлементного анализа достигает при этом области ультраследовых количеств. Дальнейшее преимущество этого гибридного метода состоит в значительном исключении загрязнения масс-спектрометра матрицей [6.36]. Благодаря селективности ИСП метода по отношению к элементам возможный сознательный отказ от хроматографического разделения следовых компонентов, в комбинации со сбором данных в определенные отрезки времени, позволяет достичь максимальной чувствительности этого комбинированного метода в режиме он-лайн.

6.6. Параллельный ионный хроматограф

Тогда как в ионной хроматографии согласно механизму разделения в одном хроматографическом цикле можно определить соответственно только анионы или катионы, объединение анионообменных и катионообменных носителей в одной системе дает возможность одновременного анализа катионов и анионов в одной пробе. Для этого нужны два детектора и два ВЭЖХ насоса, один из которых подает элюент на колонку с катионообменником, а другой — на колонку с анионообменником. Рис. 6.18 показывает схему устройства параллельного ионного хрома-

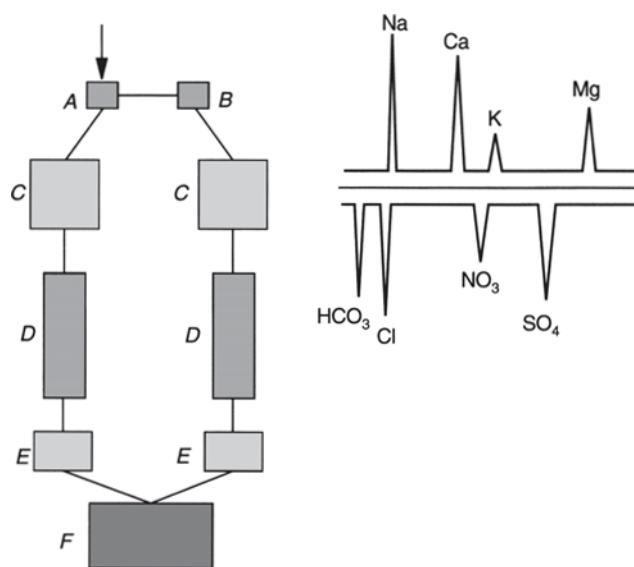


Рис. 6.18. Анализ питьевой воды на параллельном ионном хроматографе. *A* — ввод пробы; *B* — комбинированный инжектор; *C* — ВЭЖХ насос; *D* — ионообменная колонка; *E* — детекторы; *F* — двухканальный интегратор

тографа. Пробу одновременно подают на две параллельно соединенные колонки через систему двух кранов ввода пробы [6.37].

Для обработки хроматограмм достаточно двухканальной интегрирующей системы. При введении пробы в систему ввода заполняются две петли. Механически связанные друг с другом рычаги обоих инжекторов поворачиваются вместе, и таким образом происходит одновременная подача проб на катионообменник и анионообменник.

6.7. Колонки для ионообменной хроматографии

Используемые в ионной хроматографии материалы сорбентов отличаются основой, которая является либо полимером, либо силикагелем, величиной зерна, степенью сшивки, пористостью, а также покрытием и функциональными группами. Дополнительными параметрами являются собственные размеры колонки, ее длина и диаметр.

В качестве материалов носителя используются либо полимерные смолы, либо силикагель, причем последний имеет тот недостаток, что не обладает такой рН-стабильностью как синтетические ионообменные смолы. В случае стационарных фаз на полимерной основе речь идет о полистиролдивинилбензольной смоле или о сополимерах поливинилового спирта. Эти материалы хороши тем, что проявляют стабильность в широкой области рН от 0 до 14. С ними не нужно вводить никаких ограничений в отношении элюентов.

Полимерные колонки устойчивы к давлению, диаметр частиц лежит в области от 5 до 25 мкм. Ионообменные группы ковалентно связаны с полимером. Для анализа анионов применяется смола с четвертичными аммониевыми группами. Избирательность и эффективность анионной колонки варьируют изменением функциональных групп аммонийного основания, степенью сшивки и размером частиц. Для анализа катионов применяются полимеры, содержащие сульфогруппы.

Как и в других хроматографических методах, в ИХ также наблюдаются эффекты, которые влияют на эффективность хроматографического разделения. К ним относятся ухудшение разрешения и эффективности ионного обмена, а также повышение противодавления в колонке. Уменьшение разделяющей способности ионообменника часто можно приписать блокировке функциональных групп веществами, имеющими сравнительно высокое сродство к стационарной фазе. Поэтому колонки следует время от времени промывать подходящими элюентами, чтобы удалять эти загрязнения.

Дополнительно существуют различные предколонки, носитель в которых соответствует носителю в хроматографической колонке. Использование предколонки может значительно повысить срок службы хроматографической колонки. Предколонки действуют как фильтры и поглощают загрязнения, которые уже есть в пробе и/или в элюенте. Так как эффективность предколонок ограничена, они также должны время от времени промываться. С помощью предколонок можно также отделять мешающие компоненты или концентрировать вещества.

6.8. Варианты применения

Ионная хроматография отличается своей селективностью и чувствительностью при анализе органических и неорганических анионов и катионов. Большое число вариантов ее применения — это доказательство возможностей этого метода [6.38]. Определение ионных соединений в растворах — это классическая аналитическая проблема со множеством возможных вариантов решения. При этом основные прикладные вопросы хроматографии ионов лежат, прежде всего, в области анализа анионов, для которых нет подходящей альтернативы при определении следовых количеств. Обычные химические методы, такие как титрование и гравиметрия для определения хлорид-, фосфат-, нитрат- и сульфат-анионов являются трудоемкими, требуют много времени и иногда дают ошибочные результаты. Недостаток в высокочувствительных методах определения анионов можно устранить внедрением ионной хроматографии и, таким образом, закрыть существенный пробел в инструментальном анализе.

В области анализа катионов соотношения методов выглядят по-другому. Здесь уже перед внедрением ионной хроматографии в распоряжении находились эффективные методы анализов, которые сегодня достигли очень высокого уровня развития и представляют укоренившиеся и хорошо изученные методы аналитических лабораторий. Прежде всего, следует назвать методы атомной спектроскопии: атомно-абсорбционную и атомно-эмиссионную. У атомной эмиссии есть то дополнительное преимущество, что возможно одновременное определение многих элементов. Высокочувствительная плазменная масс-спектрометрия без труда открывает область ppm концентраций. Ионная хроматография не может вытеснить эти процессы. Однако у нее есть то решающее преимущество, что она разделяет катионы согласно их валентности. Методами атомной спектроскопии этого сделать нельзя, они дают лишь соответствующее суммарное содержание элемента. Однако вопрос о видах ионов в области следовых и ультраследовых количеств приобретает все большее значение, что может дать ионной хроматографии решающее преимущество. Если, наконец, ионную хроматографию объединяют с атомно-спектрометрическими методами, то они из конкурентов превращаются в партнеров. Ионы после хроматографического разделения попадают в спектрометр в разное время. Матричные эффекты из-за сложного состава пробы, которым следует уделять особое внимание при атомно-спектрометрических методах, практически отсутствуют.

Наряду с этим новым многообещающим, но дорогим гибридом ионная хроматография применяется сегодня, естественно, во многих областях рутинного анализа. Список приложений настолько велик, что его нельзя перечислить здесь полностью. Вероятно, упрощенно можно говорить о том, что все заряженные частицы, которые можно определить в водном растворе с помощью ионной хроматографии, уже определяются этим методом.

Особого значения ионная хроматография достигла в области количественного анализа анионов в воде всех видов [6.39]. Таким образом, меньше чем за 10 мин одновременно могут определяться фторид-, хлорид-, фосфат-, нитрат- и сульфат-ионы, от концентраций которых зависит качество воды. Высокая чувствитель-

ность и возможность автоматизации в значительной мере способствовали быстрому распространению метода [6.40]. При использовании химического подавления, т.е. при определении с непосредственным вводом пробы, для отдельных ионов без предконцентрирования возможные пределы обнаружения находятся около 10 ppb.

Объекты со сложной матрицей, например, сточные воды или экстракты почв, также могут легко исследоваться с помощью ионной хроматографии. Применяемые в этой области ион-селективные электроды часто отличаются коротким временем жизни и плохой чувствительностью.

6.8.1. ИХ в химии электроэнергетики

В области электроэнергетики ставятся очень высокие требования к чистоте воды, которая непрерывно контролируется путем измерения электрической проводимости [6.41]. В рамках обычного производственного контроля с помощью этого метода локализируют разгерметизацию конденсаторов и наблюдают за работой сооружений для водоподготовки. Измерение проводимости, однако, неспецифично, так как повышение измеряемого сигнала ничего не говорит о виде загрязнения. Для нахождения самых незначительных протечек в сооружении нужно определять загрязнение хлоридами или сульфатами в области нескольких ppb.

Определение хлорида и сульфата с помощью концентрирующей колонки возможно вплоть до области ppt концентраций. Однако этот анализ ультрамалых концентраций требует очень тщательно согласованной общей концепции проведения анализа. Так как оба этих иона присутствуют практически повсюду, то необходимо избегать каких-либо загрязнений при подготовке и вводе пробы. При этом предконцентрирование происходит из закрытого кольцевого трубопровода, чтобы прокачать через концентрирующую колонку с помощью насоса строго определенное количество чистой воды. После переключения крана ввода сконцентрированные на концентрирующей колонке ионы переносятся на аналитическую колонку и там разделяются.

Ионная хроматография также успешно применяется при контроле устройств для удаления серы и азота из дыма, который содержит множество неорганических ионов. При удалении серы сульфиты окисляются до сульфатов, наряду с этим возникает небольшое количество других соединений серы, как, например, дитионат, которые все можно определить с помощью ионной хроматографии. При удалении азотсодержащих соединений из дыма в первую очередь проводят анализ на нитриты и нитраты.

6.8.2. ИХ в гальванотехнической промышленности

Гальванические ванны для декоративной или функциональной обработки металла содержат, как правило, граммовые количества соли металла и минеральной кислоты. Для определения этих основных компонентов ионная хроматография как метод анализа следовых количеств подходит меньше, так как пробы нужно сильно разбавлять для хроматографического разделения. Для определения ионов металла и анионов в высоких концентрациях существуют подходящие методы титрования и титрующие автоматы.

Вместе с тем есть гальванические ванны, в которых для управления условиями покрытия специально добавляют ионы в количествах в области ppm. К ним принадлежит, например, применяемый в изготовлении печатных плат кислый медный электролит на основе сульфата меди и серной кислоты. Он содержит в большинстве случаев хлорид в концентрации от 40 до 100 мг/л. Это низкое содержание хлорида наряду с высоким избытком сульфата определяется с помощью ионной хроматографии.

Состав гальванических ванн тщательно согласовывают при введении новых добавок для получения желаемых качеств слоя металла при функциональной и декоративной обработке. Наряду с неорганическими компонентами, солями и кислотами часто нужно добавлять также органические вещества для целенаправленного управления качествами слоя металла. Отдельные ингредиенты при этом подвергаются разложению; образуются продукты взаимодействий и продукты разложения. Состав, таким образом, постоянно изменяется и его необходимо соответствующим образом корректировать. Для рутинного контроля здесь оказывается полезной ионная хроматография благодаря быстрому и надежному анализу состава электролита в ванне [6.42]. Пробоподготовка почти во всех случаях ограничивается простым разбавлением деионизированной водой и последующей фильтрацией.

Преимущество ионной хроматографии по сравнению с применяемыми до сих пор и часто неспецифическими методами традиционной химии состоит, прежде всего, в избирательности процесса. С ростом издержек производства на качественные дорогостоящие продукты возникла необходимость применять новые методы анализов, которые способствуют лучшему пониманию сложных процессов в гальванических ваннах. Как при разработке новых ванн, так и при контроле в процессе производства ИХ позволяет следить за содержанием добавок в электролитах. С помощью этих данных можно целенаправленно управлять желаемыми качествами возникающих металлических слоев. Табл. 6.3 дает небольшой обзор различных возможностей использования ИХ в анализе электролитов гальванических ванн.

Таблица 6.3. Примеры использования ИХ в гальванической промышленности

Электролит	Примеры анализов
Медь в серной или соляной кислоте или в их смеси	Муравьиная кислота, винная кислота, триэтаноламин, ЭДТУ, $[\text{Cu}(\text{ЭДТУ})]^{2-}$
Кислая медь	Хлорид, сульфат, примеси металлов (Ni, Zn и т. д.), органические добавки
Пирофосфат меди	Аммоний-катион, ортофосфат, нитрат
Цианид меди	Медь, цианид
Сульфамат никеля	Сульфамат, хлорид, сульфат, аммоний-катион
Никель/железо	Никель, железо, натрий, медь
Никель в серной или соляной кислоте или в их смеси Никель/кобальт	Гипофосфит, фосфит, фосфат, лимонная кислота, молочная кислота, никель, кобальт
Цианидные комплексы золота	$[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$, $[\text{Au}(\text{CN})_4]^-$, $[\text{Co}(\text{CN})_6]^{3-}$, свободный цианид, хлорид, фосфат, карбонат

В области гальванотехники существуют многочисленные приложения, в которых осаждение металлов производится в электролитных ваннах как за счет электролиза, так и без использования электричества. В особенности в растворах электролитов, которые используют без применения электрического тока, происходят значительные химические превращения веществ. Содержащийся в электролитной ванне химический восстановитель интенсивно расходуется по мере параллельного накопления образующихся продуктов окисления. Для безупречной работы эти ванны требуют постоянного контроля химического состава электролита, чтобы на основе аналитических данных можно было проводить соответствующую коррекцию состава.

Работающие без применения электричества ванны для никелирования содержат в большинстве случаев в качестве восстановителя гипофосфит натрия, который окисляется при выделении никеля до фосфита. Для поддержания постоянной скорости восстановления гипофосфит должен постоянно добавляться в электролит; накопление фосфита ведет к ограничению срока эксплуатации электролита, который затем должен утилизироваться. Совместный анализ гипофосфита и фосфита методами классической химии – весьма дорогостоящий метод. Ионная хроматография, просто после разбавления раствора электролита, позволяет за несколько минут количественно определить оба иона.

Ионная хроматография особенно подходит для анализа в области гальванотехники благородных металлов. Очень тщательный аналитический контроль в ходе покрытия необходим здесь как из-за необходимости использовать для анализа возможно меньшие количества электролита, ввиду его высокой стоимости, так и из-за высоких издержек в случае плохого качества покрытия. Стандартные электролиты для выделения золота содержат его в большинстве случаев в форме цианокомплексов наряду с избытком свободного цианида. Так как золото может существовать как в одновалентной, так и в трехвалентной форме, в присутствии избытка цианида существуют анионные цианокомплексы $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ и $[\text{Au}(\text{CN})_4]^-$. Классическими методами анализа, а именно ААС, осаждением или титрованием, после дорогостоящей пробоподготовки можно определить лишь общее содержание золота. Эти методы не позволяют различать элементы по степеням окисления. Цианокомплексы золота, благодаря их стабильности, можно разделить и затем количественно определить с помощью ИХ (рис. 6.19).

Так как золото – это относительно мягкий металл, его часто легируют кобальтом для повышения твердости. При этом кобальт добавляется в электролит в виде сульфата, и затем он осаждается совместно с золотом. Образующийся со временем цианокомплекс кобальта $[\text{Co}(\text{CN})_6]^{3-}$, который не повышает твердость золота, можно определять с помощью ионной хроматографии одновременно с цианокомплексами золота. Далее, такие основные компоненты, как фосфат и цитрат, а также примеси хлорида и железа, также могут быть легко определены с помощью ионной хроматографии.

Свободные цианид-анионы могут детектироваться с помощью амперометрии в области следовых количеств. Метод находит применение при аналитическом контроле промывных и сточных вод из гальванических ванн, содержащих цианиды. С помощью ИХ можно также анализировать компонент, ответственный за

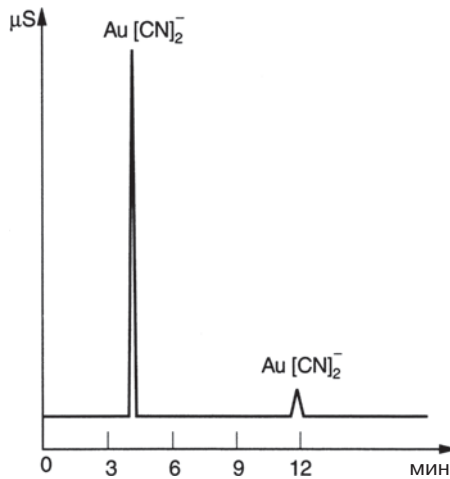


Рис. 6.19. Разделение ионов Au^{+1} и Au^{3+} в виде цианоккомплексов в электролите гальванической ванны

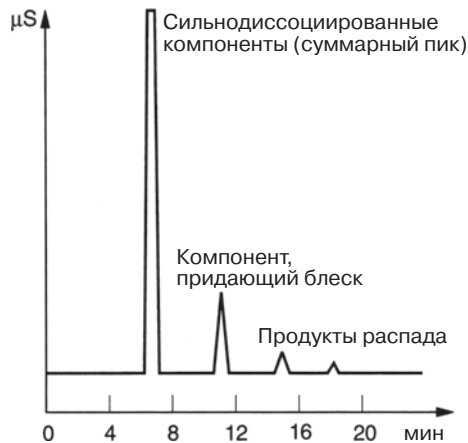


Рис. 6.20. Хроматограмма электролита, содержащего цианид меди с придающим блеск компонентом

нанесение блеска, в ванне с раствором цианида меди. Сильно диссоциированные компоненты раствора элюируются с мертвым объемом. Компоненты, элюирующиеся при 11,3 мин соотв. при 18,1 мин (рис. 6.20), можно обнаружить только в использованном электролите, и они могут быть идентифицированы как продукты разложения компонента, придающего блеск [6.43].

6.8.3. ИХ в полупроводниковой промышленности

Сегодня полупроводниковая промышленность предъявляет высочайшие требования к чистоте используемых реагентов. Геометрия конструктивных элементов в субмикронной области требует исключения каких-либо загрязнений и использо-

вания высокочистых реагентов в чистых комнатах. Применение высокоочищенной воды является важным фактором в полупроводниковой промышленности, так как ионные примеси влияют на долговечность и функциональную способность этих конструктивных элементов.

Институт полупроводниковых приборов и материалов (англ.: SEMI Semiconductor equipment and materials institute) предлагает методы для идентификации и количественного определения соединений, которые могут оказывать влияние на поведение этих микроэлектронных конструктивных элементов. В области производства полупроводниковых деталей ИХ используется как эффективный метод определения ионов.

6.8.4. ИХ в пищевой промышленности

Высокие требования к качеству продукции предъявляются также в пищевой промышленности. Из экономических соображений и для исключения человеческих ошибок методы производства продуктов были в значительной степени автоматизированы. Чтобы производить продукты с одинаковым качеством и вкусом, необходим аналитический контроль. Это следует, например, из определения нитрата в овощах, после того как стало известно, что даже детское питание может содержать высокую концентрацию нитрата, который попадает в овощи из средств обработки растений. В таких случаях ионная хроматография дает возможность проще, быстрее и более точно определять неорганические и органические анионы и катионы в сложной матрице [6.44].

Ионная хроматография, как метод анализа, все больше признается многими контрольными лабораториями и научно-исследовательскими лабораториями пищевой промышленности, так как для анализа требуется лишь минимальная пробоподготовка [6.45]. Большое преимущество ИХ состоит в легком приготовлении пробы из сложных матриц. Пробы этого вида экстрагируют деионизированной водой, и этот экстракт, после фильтрации, вводят непосредственно на колонку.

6.8.5. Другие возможности применения

Ионная хроматография применяется в области медицины для определения ионных веществ естественного или искусственного происхождения в моче. Определение неорганических ионов в сыворотке или плазме крови происходит после осаждения белков. Для этого к пробе добавляют в равном объемном соотношении ацетонитрил или другой подходящий растворитель для осаждения белка. После отделения осадка с помощью центрифуги часть прозрачного раствора пробы вводится в хроматограф [6.46]. Ионную хроматографию можно успешно применять также для анализа почечных камней, которые состоят преимущественно из натриевой соли мочевой кислоты. После удаления почечного камня проводят полный анализ катионов, Na^+ , K^+ , NH_4^+ и Ca^{2+} , и анионов, урата, оксалата, хлорида и сульфата [6.47].

Дополнительные возможности использования ИХ заключаются в контроле медикаментов и инфузионных растворов [6.48]. Многие медикаменты обладают собственной ионной природой и для повышения стабильности и растворимости активного вещества в терапевтических количествах их производят в солевой форме. При этом часто речь идет об аминах в форме гидрохлоридов или об органических



ких кислотах в форме натриевых солей или соли с этаноламином. В области анализа моющих средств основные компоненты чистящих средств можно определять очень быстро методом ИХ в виде пиррофосфата, триполифосфата, ЭДТУ и заменителя фосфата НТУ (нитрилотриуксусной кислоты).

6.9. Выводы и перспективы

Ионную хроматографию предложили в 1975 году для разделения ионных соединений. Разделение может происходить благодаря образованию ионных пар, ионному обмену или эксклюзии ионов, причем детектирование в большинстве случаев основано на измерении электрической проводимости. Благодаря таким методам детектирования, как УФ спектрофотометрия, флуорометрия и амперометрия, ИХ превратилась в очень разностороннюю технику анализа не только ионных, но и полярных соединений.

В случае ионной хроматографии речь идет об одном из вариантов жидкостной хроматографии, поэтому, что касается инструментального оформления и использования, ИХ имеет много общего с ВЭЖХ. Таким образом, ИХ легко автоматизируется и интегрируется в лабораторную систему данных.

При ионообменной хроматографии следует различать два процесса: одноклоночную технику (англ.: single column ion chromatography, SCIC) и ИХ с химическим подавлением проводимости элюента, где между колонкой и детектором по электропроводности происходит химическое подавление собственной (фоновой) проводимости подвижной фазы. Одноклоночная хроматография – это быстрый, простой и низкобюджетный метод анализа большинства ионных соединений. Более дорогая техника подавления проводимости позволяет определять следовые количества ионов вплоть до области ppb концентраций. Сегодня этот метод, наряду с лидером на рынке ионной хроматографии фирмой Dionex, предлагает также и второй по величине поставщик оборудования для ИХ фирма Metrohm, так что здесь следует ожидать дальнейшего развития рынка.

Ионная хроматография исключительно подходит для селективных и, в то же время, одновременных определений ионов в смесях с большим линейным рабочим диапазоном и является, таким образом, важным дополнением к аналитическим методам классической химии и вольтамперометрии. В особенности там, где анионы и катионы можно определить только очень трудоемкими методами, ионную хроматографию выбирают как метод, позволяющий одновременное и поэтому очень быстрое определение ионов. При незначительном объеме пробы она обладает высокой эффективностью определения множества ионов. Таким образом, ионные хроматографы находят применение преимущественно в области охраны окружающей среды и управления качеством продукции, а также в области самых различных исследовательских задач химической промышленности. ИХ является методом, предписанным немецким промышленным стандартом (нем.: DIN) для анализа питьевой воды и сточных вод.

Несмотря на это следует помнить, что ИХ дает возможность только ионного анализа. Для более простых задач часто выбирают титриметрию, потенциометрию или вольтамперометрию.

ГЛАВА 7

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Капиллярный электрофорез (КЭ) – это относительно молодой метод анализов, который однако бурно развивается. Он подходит для разделения полярных и ионных проб и дополняет классические методы разделения, такие как ВЭЖХ и ГХ [7.1]. Все методы электрофоретического разделения основываются на принципе разной скорости миграции заряженных частиц и молекул в постоянном электрическом поле.

Капиллярный электрофорез объединяет различные методы электрофореза и хроматографии в отдельный метод, который обеспечивает воспроизводимое разделение с высоким разрешением в течение короткого времени с высокой чувствительностью вплоть до области следовых количеств. Дополнительно коммерческое оборудование для капиллярного электрофореза предлагает возможность автоматического ввода пробы, микропрепаративного сбора фракций, компьютерного управления и получения данных, а также регистрации проб с помощью УФ-, флуоресцентных, радиохимических или электрохимических детекторов, а также масс-спектрометров и детекторов по электропроводности [7.2].

Первые работы по электрофорезу были связаны, в основном, с разделением биомакромолекул (ДНК, белки). Настоящий прорыв в рутинном анализе произошел, между тем, благодаря применению этого метода для разделения и определения малых молекул и внедрению коммерческих устройств в 1989 году [7.3]. Рекордами в области анализа неорганических анионов и катионов с помощью капиллярного электрофореза следует считать:

- абсолютный мировой рекорд по числу обнаруженных молекул при анализе следовых количеств составляет около 600 молекул при детектировании с помощью лазерындуцированной флуоресценции [7.4],
- определение 1/2 молекул на каплю при комбинировании КЭ-МС,
- рекорд в области скорости анализов (30 веществ за 90 с).

Для практического анализа эти рекорды имеют только второстепенное значение. Но все же у ионной хроматографии появился достойный конкурент. В одном капилляре могут анализироваться друг за другом катионы и анионы, причем необходима только смена буфера. Недостатком метода является наличие лишь небольшого числа чувствительных детекторов; сегодня коммерчески доступным является только УФ/ВИД детектор. С помощью косвенной УФ детекции в КЭ может анализироваться только область концентраций примерно от 10 ppb до 500 ppm, причем динамический диапазон ограничен двумя порядками. В области следовых количеств ионная хроматография может сохранить свое доминирующее положение. Но и здесь можно ожидать дальнейшего прогресса с использованием других методов детектирования [7.5].

При этом капиллярный электрофорез в различных вариантах не ограничивается анализом только ионов. Нейтральные молекулы могут разделяться с помо-



щью мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ). В этом методе к буферу добавляются мицеллообразующие ионогенные вещества. Если нейтральные молекулы находятся в мицеллах, они перемещаются в электрическом поле к детектору; в буфере они неподвижны. После того как распределение накладывается на миграцию, речь при МЭКХ может идти о настоящем хроматографическом процессе. Возможности применения этого метода раскрыты еще не полностью.

7.1. История и развитие

Принцип электрофореза известен с начала 19-го столетия. Тем не менее, процесс, называемый в то время «катафорезом», из-за сложных устройств для получения электричества применялся только для исследования физических основ обнаруженного явления. Основой электрофоретического разделения является различная скорость миграции веществ в электрическом поле. Электрофорез как метод разделения был предложен в Швеции Арне В. К. Тизелиусом в 1937 году [7.6]. Он обнаружил, что смесь белков мигрирует в наполненной буфером трубке под действием приложенного напряжения в одном направлении и скорость миграции зависит от заряда и подвижности отдельных белков. Тизелиус из Упсалы получил Нобелевскую премию по химии в 1948 году за работы по электрофорезу и адсорбции, в частности, за открытие сложной природы белков сыворотки крови.

Методом электрофореза теперь можно было наблюдать миграцию макромолекул в электрическом поле, определять количественно отдельные компоненты смеси, а также измерять относительную скорость миграции белка как очень значимую и характерную величину. Разделяющая способность электрофореза в свободном растворе, как она проводилась Тизелиусом, была ограничена тепловой диффузией и конвекцией. Поэтому электрофорез стал проводиться в антиконвекционных средах, таких как полиакриламид или агарозные гели. Гели в форме дисков или трубок были использованы для разделения биологических макромолекул по их молекулярным весам. Электрофорез в плоском слое имеет недостатки: большая длительность анализа, невысокая эффективность и трудность детектирования и автоматизации. Альтернативой электрофорезу в плоском слое является электрофоретическое разделение в узких трубках или капиллярах.

Электрофоретические методы проводятся в двух принципиально разных средах. С одной стороны, процесс проходит в стабилизируемой антиконвекционной среде, например, полиакриламидном геле, с другой стороны, в жидкой фазе, например, в буфере. Хотя работы по зонному электрофорезу проводились Ф. М. Эверартсом и сотрудниками еще в 1979 году в Голландии, Джим Йоргенсен, ученый из университета Калифорнии, в 1981 году, используя капилляр с внутренним диаметром менее 80 мкм, впервые смог решить многие проблемы [7.7]. Прошло, однако, несколько лет, прежде чем готовые приборы стали коммерчески доступны и ускорили использование «высокоэффективного капиллярного электрофореза» (ВЭКЭ) [7.8].

Преимущество капилляров с маленьким внутренним диаметром — это большое электрическое сопротивление. Даже при высоких напряжениях от 20 до 30 кВ по

ним, согласно закону Ома, протекают очень маленькие токи от 5 до 50 мкА. Мощность, которая рассеивается капилляром, лежит в области 1 Вт. Вследствие этого тепловыделение ниже, чем при обычных электрофоретических процессах разделения. Это дает то решающее преимущество капиллярной техники, что вследствие этого обратное конвекционное перемешивание разделенных зон пробы уменьшается.

Высокие напряжения в области киловольта необходимы, чтобы ионы мигрировали в электрическом поле с достаточно высокой скоростью и проходили, таким образом, за относительно короткое время большое расстояние. Для полного разделения индивидуальных ионов требуются длины всего лишь в несколько сантиметров, которые должны быть пройдены за минуты. Используя высокое напряжение, время анализа в большинстве случаев удается снизить до менее 10 мин. Маленький внутренний диаметр капилляра обеспечивает, кроме того, очень хорошую массовую чувствительность метода, так как только несколько нанолитров объема пробы с несколькими пикограммами вещества вводятся в капилляр.

Из «примитивных» самодельных КЭ систем, состоящих из источника высокого напряжения, детектора, капилляра, сосудов для буфера и электродов, в течение последних лет «созрели» современные аналитические устройства, которые полностью удовлетворяют желаниям пользователей. Уже сегодня на европейском рынке представлены устройства от более чем десяти фирм, и, наверное, скоро появятся и другие [7.9]. В то время как при всех других хроматографических методах разделения возможно ручное проведение разделения, в капиллярном электрофорезе это больше не представляется рациональным, хотя принцип метода и очень прост. Наряду с крайне низким количеством вводимой пробы есть еще много других деталей, которые рационально можно выполнить только при автоматическом проведении анализе.

7.2. Физические основы и принцип разделения

Принцип разделения электрофореза основывается на разной миграции веществ в электрическом поле. Принцип устройства аппаратуры КЭ очень прост и показан на рис. 7.1. Последовательность анализа также очень проста. Оба конца капилляра опускают вместе с электродами в контейнер с электролитом. Капилляр наполняется буфером, на который с одной стороны наносится раствор пробы. Затем компоненты пробы разделяются под действием приложенного напряжения, так как они перемещаются в буфере с разной скоростью.

Принцип электрофореза строго подчиняется закону Ома. Для электрофоретического разделения необходимо постоянное напряжение. Буфер необходим, чтобы обеспечить электролитическую проводимость.

В капилляре конвекция и свободный поток сведены к минимуму. Поэтому высокоэффективный капиллярный электрофорез может проводиться в одном водном буфере. Без полиакриламида или агарозы в качестве поддерживающей матрицы для разделения веществ электрофорез проходит в свободном растворе, т.е. в «открытых» капиллярах. Поэтому в этом случае говорят о так называемом

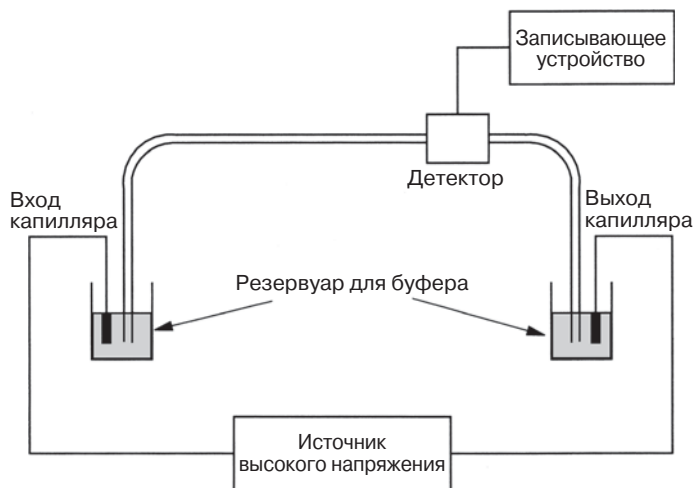


Рис. 7.1. Устройство прибора для капиллярного электрофореза

свободном зонном электрофорезе. Необходимые для этой разделительной техники приборы с питанием от сети должны создавать силу поля от 200 до 400 В/см, чтобы обеспечить достаточную подвижность ионов. Напряжение, в зависимости от длины капилляров, лежит между 5 и 25 кВ. Типичные рабочие параметры капиллярного электрофореза представлены в табл. 7.1.

КЭ имеет одно преимущество по сравнению со всеми процессами колоночной хроматографии. При разделении не нужно ждать, пока последний пик также пройдет расстояние до выхода из капилляра, так как после каждого анализа капилляр просто промывается специальным раствором и наполняется новым буфером.

Благодаря применению наполненных буфером капилляров из кварца возможно онлайн-УФ детектирование при длинах волн до 200 нм. Преимуществом прямого прохождения луча света через капилляр является то, что при этом отсутствует уширение полос, вызванное ячейкой детектора и подводными капиллярами. Такое детектирование не привносит дополнительного мертвого объема. Недостатком его, однако, является маленький внутренний диаметр капилляров от 25 до 100 мкм. Столь незначительная длина оптического пути, согласно закону Ламберта–Бера, приводит только к небольшому поглощению. Из-за этой конструктивной особенности детектирование в КЭ, по сравнению с другими разделительными процессами, — нечувствительный метод.

Таблица 7.1. Типичные параметры ВЭКЭ

Внутренний диаметр капилляра	20–100 мкм
Длина капилляра	10–150 см
Напряжение на капилляре	10–30 кВ
Сила тока	10–100 мкА
Сила поля	100–500 В/см
Выделяемое тепло	0,5–5 Вт
Объем пробы	1–50 нл

7.2.1. Электрофорез

Электрофоретическое разделение основывается на разных скоростях миграции в электрическом поле, причем скорость v иона является произведением его электрофоретической подвижности μ_e и приложенного электрического поля E :

$$v = \mu_e E,$$

где v – внутренняя скорость; μ_e – электрофоретическая подвижность; E – приложенное электрическое поле.

Электрическое поле – это просто функция приложенного напряжения и длины капилляра с размерностью В/см. Электрофоретическая подвижность данного иона в данной среде – это константа, которая рассчитывается по уравнению:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r},$$

где q – заряд иона; η – вязкость раствора; r – радиус иона.

Маленькие высокозаряженные частицы обладают высокой подвижностью; большие, обладающие низким зарядом частицы, напротив, обладают низкой подвижностью.

Более того, электрофоретическая подвижность зависит от величины рН раствора. Электрофоретическая подвижность приводится в таблицах как физическая константа, определенная при полной диссоциации электролита и экстраполяции на бесконечное разбавление. Однако на практике она отличается часто значительно, потому что так называемая эффективная подвижность во многих случаях сильно зависит от величины рН и состава используемого буфера. Различие между абсолютной и эффективной подвижностью объяснено на рис. 7.2. Здесь показаны два гипотетических раствора, которые при полной диссоциации электролита, т.е. при

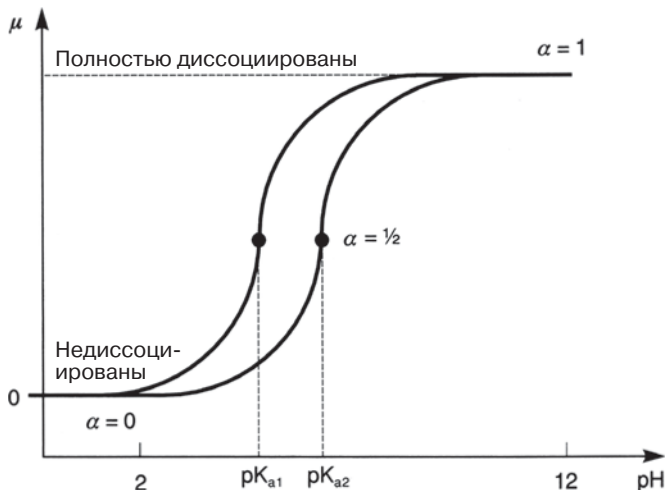


Рис. 7.2. Подвижность двух слабых кислот в зависимости от величины рН

степени диссоциации $\alpha = 1$, имеют одинаковую подвижность μ . Согласно абсолютной подвижности, взятой из произведенных таблиц, оба этих вещества кажутся неразделимыми, так как они одинаково мигрируют. Однако оба вещества имеют различные величины pK_a , т.е. подвижность зависит от pH .

7.2.2. Электроосмотический поток

Миграция веществ зависит, с одной стороны, от таких специфических для соединений параметров, как заряд и размер, а, с другой стороны, на нее влияют такие факторы, как величина pH и ионная сила рабочего буфера, сила поля и температура. Миграция осложняется электроосмотическим потоком (ЭОП), который вызван зарядами на внутренней поверхности капилляра [7.10]. ЭОП — это особенность капиллярного электрофореза и не наблюдается при обычном электрофорезе в плоском слое.

Электроосмотическое течение — это направленный к катоду поток буфера.

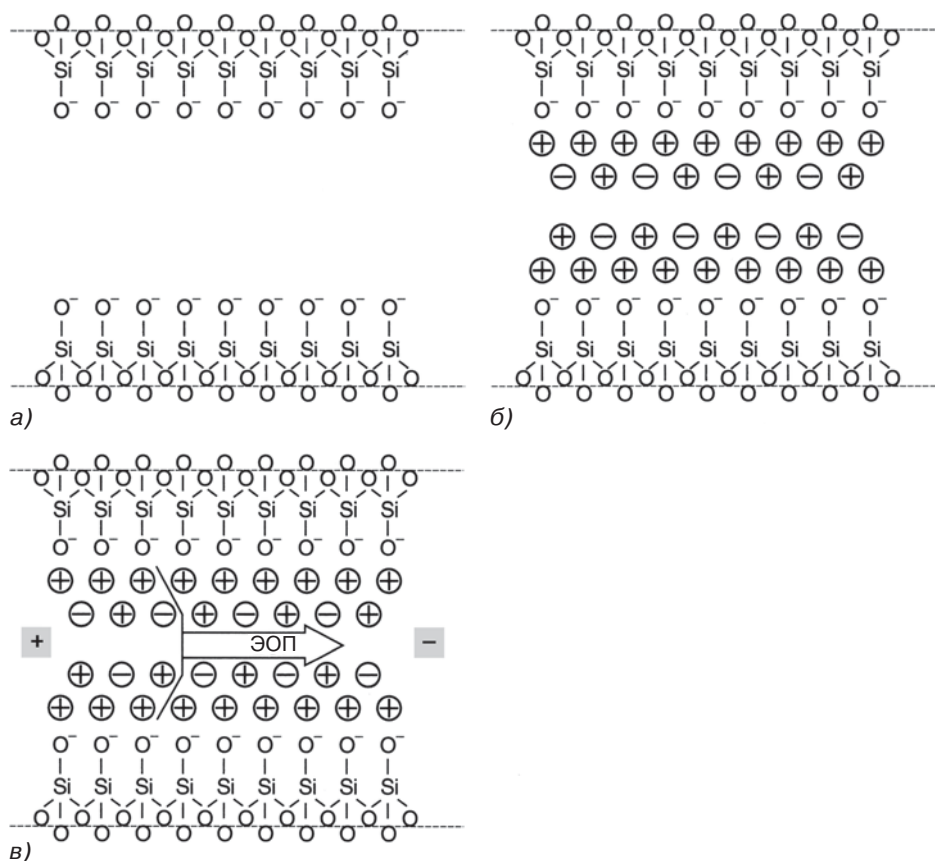


Рис. 7.3. Появление осмотического потока: а) отрицательно заряженная поверхность кварца; б) гидратированные катионы адсорбируются на поверхности; в) при наложении электрического поля раствор перемещается к катоду

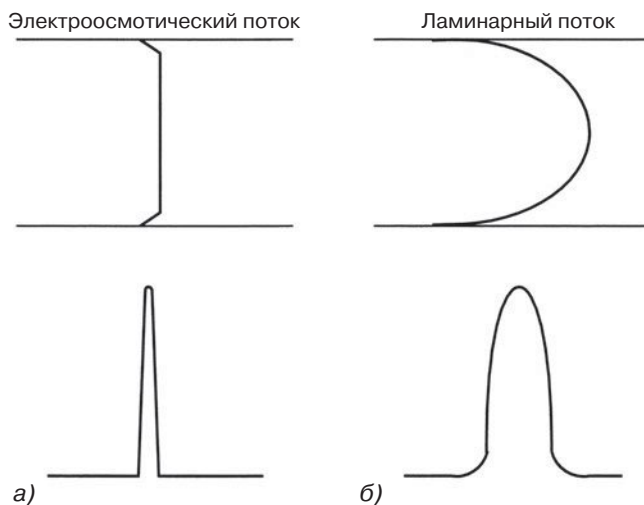


Рис. 7.4. Профиль потока и отвечающий ему профиль хроматографической зоны

В водном растворе большинство твердых поверхностей обладают избыточным отрицательным зарядом, который возникает из-за ионизации поверхности вследствие кислотно-основного равновесия и/или адсорбции ионизированных частиц на поверхности. В кварцевых капиллярах может происходить и то и другое, однако ЭОП вызван преимущественно диссоциацией силанольных групп ($-\text{SiOH}$), которые существуют в анионной форме SiO^- , как представлено на рис. 7.3а.

Для нейтрализации заряда противоионы сорбируются на поверхности и образуют двойной электрический слой, который обуславливает разность потенциалов, так называемый ζ -потенциал (рис. 7.3б). Если теперь приложить напряжение, то катионы диффузного двойного слоя мигрируют в направлении катода. Так как катионы сольватированы, то окружающий их раствор движется вместе с ними в направлении катода (рис. 7.3в).

Это электроосмотическое течение не подчиняется закону Хагена–Пуазейля о течении в капилляре под действием давления. Оно отличается от него очень плоским профилем потока. Так как движущая сила вдоль капилляра, т.е. на его внутренних стенках, однородна, то перепад давления внутри капилляра отсутствует. Этим эффектом объясняется очень незначительное уширение полос, наблюдаемое при КЭ (рис. 7.4).

7.2.3. Процесс разделения

В зонном электрофорезе разделение происходит на основе комбинации электрофоретической подвижности ионов и электроосмотического потока.

На электроосмос влияют величина наложенного напряжения величиной рН, ионная сила, вязкость буфера, добавки в элюент и различные покрытия стенок капилляра. Электрофоретическая подвижность положительных, нейтральных и

отрицательных молекул пробы различна, но все частицы под действием электроосмотического потока мигрируют обычно в направлении катода.

Скорость миграции частицы получается как сумма собственной электрофоретической подвижности и скорости электроосмотического потока.

Преимущество ЭОП состоит в том, что почти все частицы перемещаются независимо от заряда в одном и том же направлении. В нормальных условиях, т.е. при отрицательном заряде капиллярной поверхности, поток движется от анода к катоду. Анионы также движутся к катоду, так как ЭОП может больше чем на порядок превышать электрофоретическую подвижность. Это значит, что катионы, нейтральные молекулы и анионы могут разделяться электрофоретически за один анализ, так как они все мигрируют в одном и том же направлении.

- Катионы перемещаются быстрее всего, так как электрофоретическое движение и ЭОП направлены в одну и ту же сторону к катоду.
- Нейтральные молекулы переносятся со скоростью ЭОП, но не разделяются.
- Анионы мигрируют наиболее медленно, так как они притягиваются анодом, но двигаются под влиянием ЭОП к катоду.

Время миграции определяется характеристической константой подвижности ионов и коэффициентами электроосмотического потока:

$$V_{\text{ion}} = \frac{L}{t_M} = E(u_{\text{ion}} + \mu_{\text{EOF}})$$

где V_{ion} — скорость миграции; L — длина капилляра (до детектора); t_M — время миграции; E — электрическая сила поля; u_{ion} — подвижность ионов; μ_{EOF} — коэффициент ЭОП.

При анализе малых ионов (например, NaCl, KCl) их подвижность обычно настолько велика, что сравнима с ЭОП. Дополнительной модификацией поверхности капилляра ЭОП можно понизить до такой степени, пока движение анионов и катионов в положенном направлении прекратится. Особые покрытия поверхности капилляров линейными полимерами без поперечных швов элиминируют электроосмос, который характерен для непокрытых капилляров.

7.2.4. Электродисперсия

Особенностью капиллярного электрофореза является электродисперсия (рис. 7.5). Из-за этого могут наблюдаться как симметричные Гауссовы, так и треугольные несимметричные формы пиков. В то время как искаженные формы пиков с «фронтом» и «хвостами» в других хроматографических процессах могут устраняться принятием соответствующих мер, в КЭ такие формы пиков нужно рассматривать как нормальные. Они вызваны сильными различиями в проводимости пробы и буфера. Если проба имеет более высокую подвижность, чем разделительный буфер, то передняя часть зоны становится диффузной, а хвостовая часть зоны становится острой («фронтующий» пик). Наоборот, при меньшей подвижности пробы по сравнению с буфером получают острую фронтальную зону и диффузную

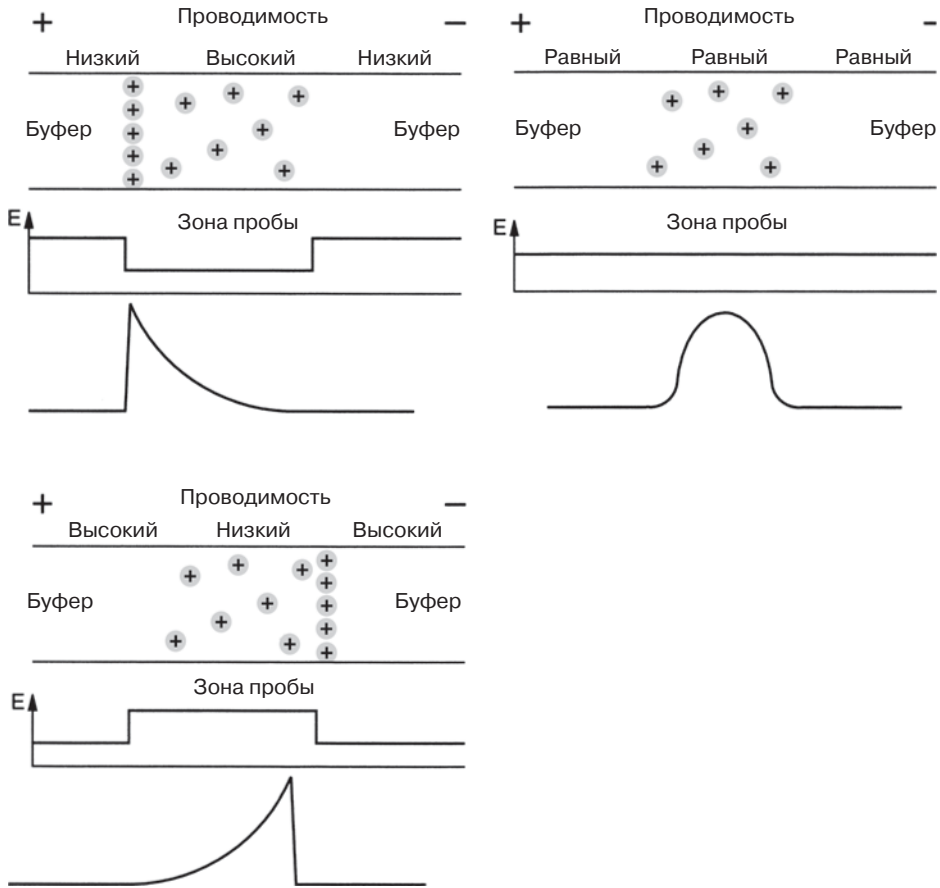


Рис. 7.5. Электродисперсия, вызванная различной проводимостью буфера и пробы

конечную зону («хвостующий» пик). Симметричные пики наблюдаются только, если обе проводимости идентичны.

Несимметричные пики обусловлены разной проводимостью и, вместе с тем, электрическим полем. Если проба имеет более высокую подвижность, т.е. и более высокую проводимость, чем буфер, то с обеих сторон – как на фронте, так и в конце зоны пробы – возникает повышенный градиент поля в переходной зоне. Градиент напряжения в конце зоны пробы направлен туда же, что и миграция пробы, так что компоненты пробы в диффузной переходной зоне ускоряются обратно в направлении переходной зоны. Из-за этого возникает острая граница у конца пика пробы.

Наоборот, частицы в передней части зоны пробы диффундируют в область более высокого градиента поля, так что они еще больше ускоряются в том же направлении. Вследствие этого передняя зона вытягивается все дальше, так что возникает «фронтонание» пика. Противоположный эффект – «хвостование» пика наблюдается, если подвижность зоны пробы меньше, чем подвижность буфера. На нейтральные частицы, напротив, не влияют эти различия проводимости.

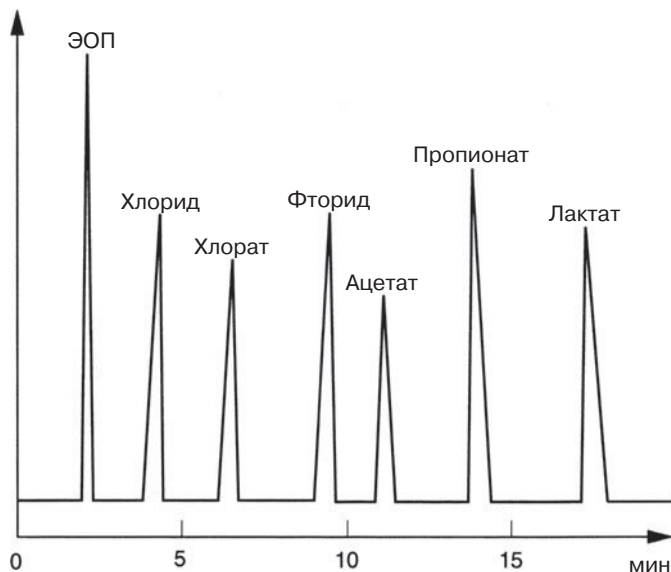


Рис. 7.6. «Фронтование» и «хвостование» пиков, как следствие электродисперсии

Хотя эта асимметрия пиков присутствует всегда, она, тем не менее, в большинстве случаев мала по сравнению с другими эффектами дисперсии, такими как диффузия. На рис. 7.6 на электрофореграмме изображены анионы, которые сильно отличаются своей подвижностью. Известно, что «фронт» наблюдается у быстроэлюируемых анионов, обладающих высокой подвижностью, пики гауссовой формы – у анионов средней подвижности и «хвостование» наблюдается у анионов с низкой подвижностью, элюируемых последними.

Если это не мешает разрешению пиков, этой асимметрией можно пренебречь. Тем не менее, ее можно также устранить, если приблизить проводимость рабочего буфера к проводимости пробы.

7.3. Различные методы разделения

В капиллярном электрофорезе проявляются различные механизмы разделения, которые перечислены в табл. 7.2 и схематически изображены на рис. 7.7. Отдельные методы КЭ подробнее разъясняются в следующих частях.

Таблица 7.2. Методы ВЭКЭ

Методы	Механизм разделения
Капиллярный зонный электрофорез	Подвижность свободного раствора
Мицеллярная электрокинетическая хроматография	Гидрофобное/ионное взаимодействие с мицеллами
Капиллярный гельэлектрофорез	Величина и нагрузка
Изоэлектрофокусировка	Изоэлектрическая точка
Изотахорофрез	«Движущиеся связи»



Рис. 7.7. Схематическое представление зонного электрофореза, изоэлектрофокусировки и изотахофореза

7.3.1. Капиллярный зонный электрофорез

Из-за простоты использования и разностронних приложений КЗЭ является наиболее часто используемым методом, который, прежде всего, применяется при разделении мелких, водорастворимых молекул. Его применяют в анализе аминокислот, пептидов, ионов, различных энантиомеров (оптически активных веществ) и многих других ионных соединений [7.11]. КЗЭ – это самая простая форма ВЭКЭ, так как капилляр наполнен только буфером. Разделение веществ на дискретные зоны происходит благодаря их миграции с различными скоростями.

Электроосмотический поток (ЭОП) делает возможным разделение как катионов, так и анионов. Нейтральные молекулы электрофоретически не мигрируют и все перемещаются с ЭОП [7.12]. Принципиальные процессы при капиллярном зонном электрофорезе представлены на рис. 7.8.

Так как электроосмотический поток может быть больше электрофоретической подвижности, то катионы, анионы и нейтральные частицы перемещаются по капилляру с разной скоростью.

- Катионы перемещаются быстрее всего, так как электрофорез и ЭОП совпадают по направлению.
- Нейтральные частицы не разделяются, они движутся только под действием ЭОП.
- Малые анионы мигрируют против ЭОП в направлении анода, так как их электрофоретическая подвижность выше, чем ЭОП.
- Большие анионы медленно мигрируют к катоду, так как их электрофоретическая подвижность ниже, чем ЭОП.

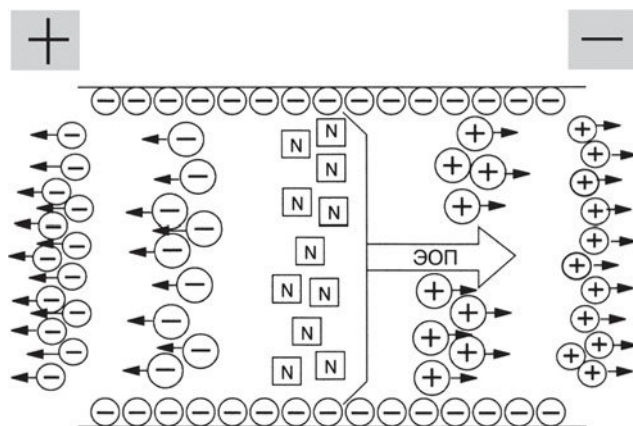


Рис. 7.8. Принцип капиллярного зонного электрофореза

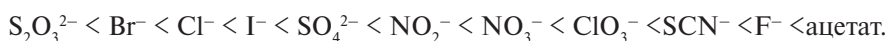
Так как электрофоретическая подвижность ионов зависит от рН, то селективность в КЗЭ можно очень просто варьировать изменением величины рН буфера. При этом тип буфера крайне важен для успешного разделения [7.13]. Разделение можно оптимизировать также добавлением поверхностно-активных веществ (ПАВ) или хиральных компонентов.

КЗЭ часто применяется в области биологии, особенно для анализа пептидов и белков. КЗЭ находит также применение в фармацевтическом анализе, исследовании метаболитов и экологическом анализе. Неорганические ионы и органические кислоты, которые традиционно определяются ионной хроматографией, могут анализироваться также КЗЭ. Так как ионы, в общем, не являются хромофорами и даже не поглощают ультрафиолетовый свет, то нужно работать с косвенным УФ детектированием. Для этого в качестве буфера используются растворы хромата или имидазола и детектируются при длине волны наибольшего поглощения буфера (например, 254 нм для хромата).

Ионы элюируемой пробы вытесняют ионы хромата и, таким образом, уменьшают поглощение, вследствие чего появляются «отрицательные» пики. Ввиду высокой подвижности маленьких ионов ЭОП недостаточно силен, чтобы перемещать ионы в направлении, противоположном их электрофоретическому движению, т.е. анионы перемещаются к аноду и, соответственно, малые анионы не могут анализироваться одновременно с другими компонентами пробы.

Чтобы уменьшить ЭОП или изменить его направление, к рабочему электролиту прибавляют так называемый ЭОП модификатор. Эту роль играет, например, гидрофобная соль четвертичного аммонийного основания или катионные ПАВ, которые за счет адсорбции на поверхности кварца могут изменять существующее там соотношения зарядов и, таким образом, изменять ЭОП [7.141]. Действие катионных ПАВ, сорбированных на поверхности кварца, представлено на рис. 7.9.

В используемом обычно для косвенного УФ детектирования 5 миллимолярном (мМ) растворе хромата наблюдается следующая последовательность миграции:



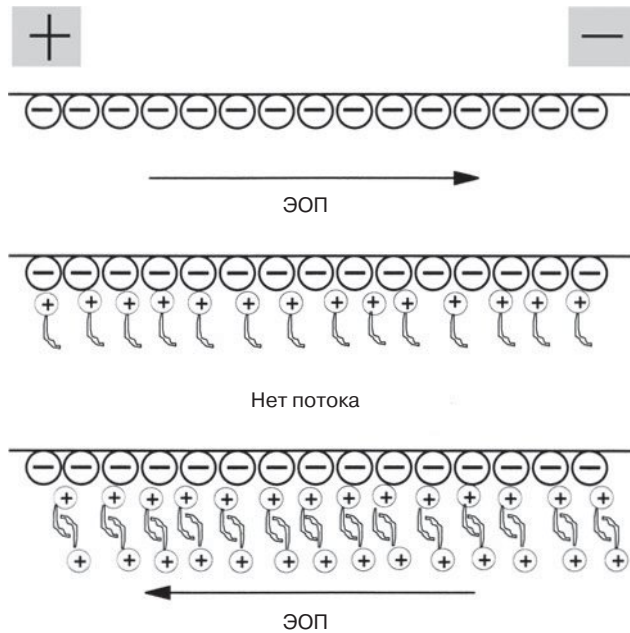
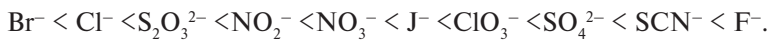


Рис. 7.9. Устранение и обращение направления ЭОП с помощью катионных ПАВ

Возможность изменять селективность разделения состоит в добавлении органических растворителей к водной буферной системе. При добавлении 20% метанола последовательность миграции нитрата и сульфата обращается, несколько других ионов также подвергаются влиянию, причем эффект в первую очередь зависит от доли органического растворителя и затем от вида растворителя.

Хромат с 30% тетрагидрофурана дает в итоге следующую последовательность миграции:



Существенное влияние на селективность разделения имеет, кроме того, ЭОП модификатор. Такая гидрофобная соль четвертичного аммонийного основания может действовать в качестве ион-парного реагента, в частности, для таких больших ионов, как иодид, тиоцианат или тиосульфат. Поэтому эти ионы при повышении концентрации модификатора или при использовании модификаторов с большей гидрофобностью избирательно сдвигаются в сторону больших времен миграции.

Разделения неорганических катионов могут проводиться, естественно, без добавления ЭОП модификаторов. В этом случае косвенная УФ детекция — это также наиболее распространенный вид детектирования, причем рабочими электролитами служат ароматические амины в протонированной форме, как обладающие поглощением в ультрафиолетовом свете. Разделения часто трудно осуществить, так как многие неорганические катионы обладают очень близкой электрофоретической подвижностью. Селективность разделения можно оптимизировать

добавлением к рабочему электролиту комплексообразователей, от слабых до умеренно сильных, которые изменяют эффективный заряд ионов.

С другой стороны, селективность разделения зависит также от вида используемого электролита в рабочем буфере и, как и в случае анионов, присутствия в нем органических растворителей. Применение 5 мМ раствора CuSO_4 вместо ароматических аминов делает возможным разделение релевантных для клинических исследований щелочных и щелочноземельных ионов в биологических жидкостях. Отделение белков перед анализом пробы не требуется.

Более селективное детектирование некоторых ионов металлов с совершенно иной селективностью возможно при их переводе в координационные соединения с помощью комплексообразования с сильными комплексообразующими реагентами перед вводом в колонку и прямым УФ детектированием, при использовании УФ неактивного рабочего электролита. Подходящие комплексообразующие реагенты – это, к примеру, 8-гидроксихинолин-5-сульфо кислота или цианиды. Такие разделения представляют интерес также для ряда промышленных процессов, при которых нужно анализировать металцианокомплексы.

7.3.2. Мицеллярная электрокинетическая хроматография

Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ) – это особый случай капиллярного электрофореза, который был введен в 1984 году С. Терабе [7.15]. Так как при КЗЭ механизм разделения основывается на разной подвижности ионов в электрическом поле, то применение этого метода ограничено заряженными частицами. МЭКХ – это гибрид электрофореза и хроматографии [7.16], который может проводиться при использовании нормальной аппаратуры для КЭ с добавлением ПАВ к электролиту.

Это единственная техника для разделения как нейтральных молекул, так и заряженных частиц. При этом разделение нейтральных молекул достигается за счет добавления ПАВ к электролиту. При концентрации выше так называемой критической концентрации мицеллообразования ККМ, ПАВ образуют большие агломераты – мицеллы. Гидрофобные цепи ПАВ направлены внутрь мицелл, гидрофильные, электрически заряженные концы – наружу, т.е. в направлении гидрофильного буфера, как это показано на рис. 7.10.

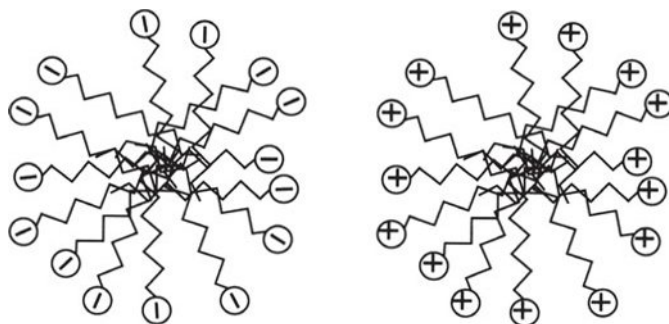


Рис. 7.10. Схематическое изображение мицелл катионных и анионных ПАВ

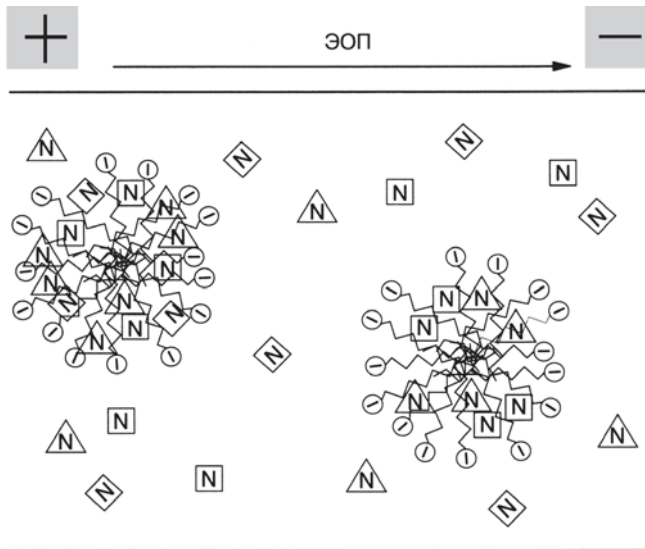


Рис. 7.11. Разделение в МЭКХ

ПАВ и поэтому также мицеллы обычно несут заряд и мигрируют, таким образом, в зависимости от заряда вместе или против ЭОП. Анионные ПАВ мигрируют к аноду, т.е. против ЭОП. Так как, однако, ЭОП в основном быстрее, чем скорость миграции мицелл, то результирующее перемещение осуществляется в направлении ЭОП. Во время миграции мицеллы могут реагировать с компонентами раствора как за счет гидрофобных, так и за счет электростатических взаимодействий.

Для нейтральной частицы разделения достигают только за счет проникновения и пребывания частиц в мицелле. Чем сильнее компоненты пробы взаимодействуют с мицеллой, тем больше время их миграции, так как анионная мицелла движется против ЭОП. Если вещество не взаимодействует с мицеллой, оно просто движется с ЭОП. Более гидрофобные вещества сильнее взаимодействуют с мицеллой и удерживаются поэтому дольше, как это показано на рис. 7.11.

Наблюдаемое разделение имеет определенное сходство с эксклюзионной хроматографией. При разделении с помощью МЭКХ все нейтральные компоненты элюируются между временем t_0 , т.е. временем удерживания компонентов, движущихся со скоростью ЭОП, и t_m , времени удерживания мицеллы (рис. 7.12).

Гидрофильные вещества, которые не взаимодействуют с мицеллами, элюируются со скоростью ЭОП, а вещества, которые постоянно удерживаются в мицеллах, элюируются вместе с мицеллами. Это, например, наблюдается у полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), которые практически полностью находятся в мицеллах и элюируются вместе с ними.

Несмотря на то что временное окно $t_0 - t_m$ часто довольно мало, пиковая емкость, обусловленная высокой эффективностью, часто очень высока. Тем не менее всегда желательно увеличить временное окно изменением условий проведения анализов. Селективность можно изменять в широких пределах, варьируя фи-

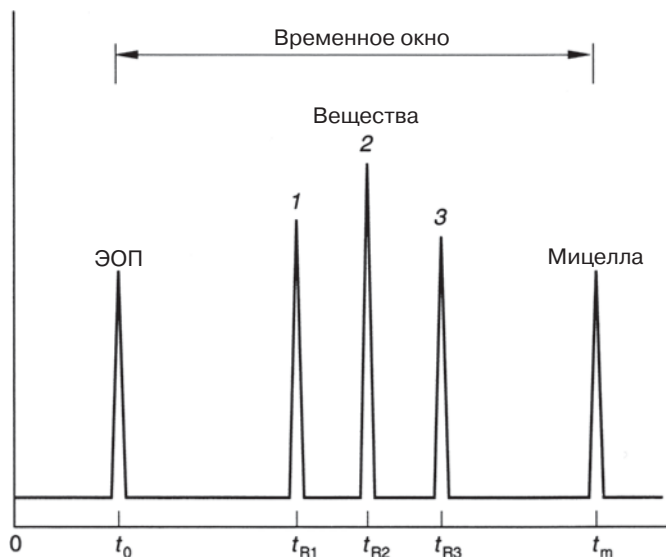


Рис. 7.12. Временное окно элюирования нейтральных соединений в МЭЖХ

зическую структуру мицелл, т.е. их величину, заряд и геометрию, и используя различные типы ПАВ. Это примерно соответствует изменению стационарной фазы в ВЭЖХ.

Как и в хроматографии, для оптимизации условий разделения можно использовать органические модификаторы, такие как метанол или ацетонитрил, причем нужно обращать внимание на то, что органические растворители могут отрицательно влиять на стабильность мицелл. Первый ПАВ, использованный как фаза для разделения, был анионным — додецил сульфат натрия, за ним последовали многочисленные анионные и катионные ПАВ, а также смешанные мицеллы, что позволяет оптимизировать селективность разделения для конкретной задачи.

Псевдостационарные фазы из резоркаренов и суспензий хроматографических частиц представляют новые и перспективные разделяющие фазы для МЭЖХ [7.17].

Резоркарены — это циклические тетрамеры, которые получают из резорцина и различных альдегидов, причем эти заместители могут подбираться в соответствии с проблемой разделения. Высокая плотность отрицательного заряда у резоркаренов обуславливает их высокую электрофоретическую подвижность, а также хорошую растворимость в электролитных растворах, в том числе и при использовании органических растворителей.

При использовании в качестве разделяющих фаз хроматографических частиц вся палитра материалов для ВЭЖХ находится в распоряжении исследователя. Частицы, которые не обладают собственной подвижностью в электрическом поле, переводятся модификацией поверхности в заряженные частицы. Например, мицеллы додецилсульфата натрия сорбируются на поверхности обращеннофазовых материалов и образуют электрически заряженную частицу. Изменяя количество частиц, можно управлять емкостью разделительной системы.

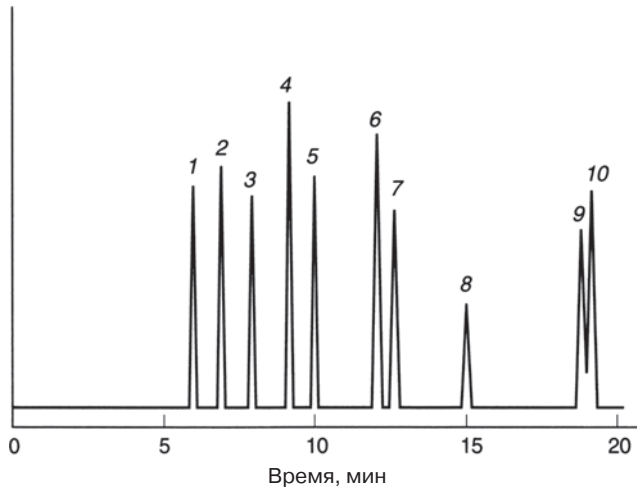


Рис. 7.13. Анализ МЭХХ различных лекарств

Область применения МЭХХ очень велика, так как могут разделяться очень разные вещества от гидрофильных до гидрофобных. Рис. 7.13 показывает анализ некоторых лекарственных соединений.

7.3.3. Капиллярный гельэлектрофорез

Гельэлектрофорез (КГЭ) принципиально был предложен для определения молекулярного веса биологических макромолекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты. Разделение происходит электрофоретически в подходящем полимере, как, например, поперечносшитый полиакриламид, агароза или же линейный полимер [7.18]. Как очевидно из рис. 7.14, полимер действует как молекулярное сито. Заряженные макромолекулы мигрируют сквозь полимерную сетку и тормозятся трением о нее, причем большие молекулы задерживаются сильнее, чем малые.

Макромолекулы, такие как ДНК (деоксирибонуклеиновая кислота), не могут быть разделены без использования геля, так как соотношение их массы к заряду не зависит от величины молекулы. Это означает, что в случае ДНК каждое последующее присоединение нуклеотида к цепи ДНК увеличивает соответствен-

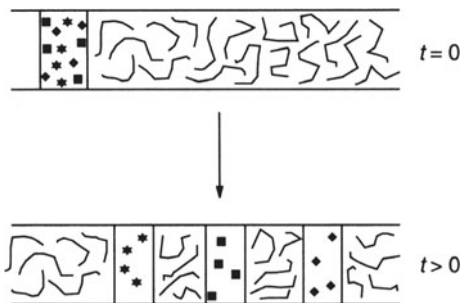


Рис. 7.14. Разделение молекул по размеру при КГЭ

но массу и заряд и, следовательно, не изменяют вследствие этого подвижность молекулы в свободном растворе.

Разделение белков из тканей или клеточных культур может применяться для сравнительного исследования ткани больного и здоровой ткани, чтобы найти в измененных белках причину заболевания [7.19]. КГЭ сравним непосредственно с электрофорезом в пластинках геля, но обладает, однако, тем преимуществом, что сила поля может быть выше в 10–100 раз без заметного выделения тепла.

7.3.4. Капиллярная изоэлектрофокусировка

КИЭФ – это электрофоретическая техника высокого разрешения для разделения пептидов и белков на основе их изоэлектрической точки, которая была разработана шведским исследователем Х. Свенсоном. Градиент рН формируется внутри капилляра амфолитами. Амфолиты – это молекулы, которые обладают как основными, так и кислотными свойствами, т.е. это цвиттерионны, которые могут, например, принимать значения рН от 3 до 9. После наполнения капилляра смесью пробы и амфолитов в капилляре формируется градиент с щелочным раствором у катода и кислым раствором у анода, как это показано на рис. 7.15.

При наложении электрического поля заряженные амфолиты и белки мигрируют в капилляре до тех пор, пока не достигнут зоны с величиной рН, где они становятся электронейтральными, т.е. в изоэлектрической точке. Зоны пробы остаются четко очерченными, так как молекула, которая покидает такую зону, снова заряжается и соответственно возвращается обратно. Процесс «фокусирования» характеризуется протеканием электрического тока через капилляр, тогда как затем, после установления состояния равновесия, никакой ток больше не течет. После фокусировки раствор выдавливается из капилляра под давлением и поступает в детектор [7.20].

Так как пробу вносят в капилляр в смеси с амфолитами, можно вводить существенно более высокие объемы пробы по сравнению с другими методами ВЭКЭ. Единственный лимитирующий фактор – это выпадение различных веществ в осадок при превышении их растворимости. КИЭФ можно успешно применять для всех проб, которые обычно трудно анализировать другими методами, таких как

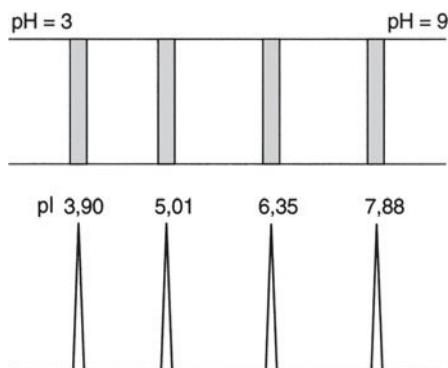


Рис. 7.15. Принцип изоэлектрической фокусировки в капилляре

гемоглобин и другие биологические пробы. Возможно масштабирование до препаративного формата, причем самым важным фактором является выделение джоулева тепла, так как при нагревании раствора сфокусированные зоны расплываются из-за диффузии. С помощью специальных поперечно расположенных к направлению тока охлаждающих капилляров объем камеры может быть повышен до более чем 100 л [7.21].

7.3.5. Капиллярный изотахофорез

При изотахофорезе (КИТФ, электрофорез с равными скоростями) компоненты пробы разделяются благодаря различию своих электрофоретических подвижностей. В этом методе отдельные фракции мигрируют в порядке убывания электрофоретической подвижности, но, в отличие от других методов электрофореза, с одинаковыми скоростями.

Капиллярный изотахофорез – это электрокинетический метод разделения с «мигрирующими границами». При этом разделения ионов в электрическом поле достигают благодаря их специфической подвижности. Благодаря комбинации двух буферных систем разделенные фракции мигрируют с одинаковой скоростью. Зоны находятся подобно сэндвичу между ведущим (фронтальным) и замыкающим электролитами. Подвижность ионов зависит от внутреннего радиуса и заряда, а также от вязкости буфера. Так как подвижность ионов дополнительно зависит от степени диссоциации, ее можно варьировать, изменяя величину рН буфера. Методом ИТФ можно определять либо катионы, либо анионы. Он удобен при анализе органических кислот и оснований, например, аминокислот, пептидов, нуклеотидов, нуклеозидов, биополимеров, синтетических полимеров, а также неорганических солей.

В противоположность капиллярному зонному электрофорезу здесь используется ограниченная система электролитов. Например, для анализа анионов буфер следует выбирать таким образом, чтобы ведущий электролит содержал анион с эффективной подвижностью, превышающей подвижность пробы. Наоборот, подвижность замыкающего электролита должна быть меньше подвижности пробы.

Проба остается на границе между ведущим и замыкающим электролитом. При наложении электрического поля анионы начинают мигрировать к аноду. Быстрее всех мигрируют ведущие анионы с наибольшей подвижностью. Ионы с более низкой подвижностью вынуждены следовать непосредственно за ионами с более высокой подвижностью, так они попадают в зону с более высокой силой поля и снова ускоряются за счет более высокой силы поля. После установки стационарного режима образуются зоны, которые мигрируют с одинаковой скоростью. Как следует из названия «изотахо», индивидуальные анионы мигрируют при ИТФ в дискретных зонах, однако с той же скоростью, которая задана скоростью лидирующих анионов (рис. 7.16).

Равномерная скорость в ИТФ поддерживается благодаря тому, что электрическое поле в каждой зоне различно. Так как скорость движения иона задана его подвижностью и силой поля, то поле регулируется для поддержания постоянной скорости. Это означает, что самое слабое электрическое поле находится в зоне

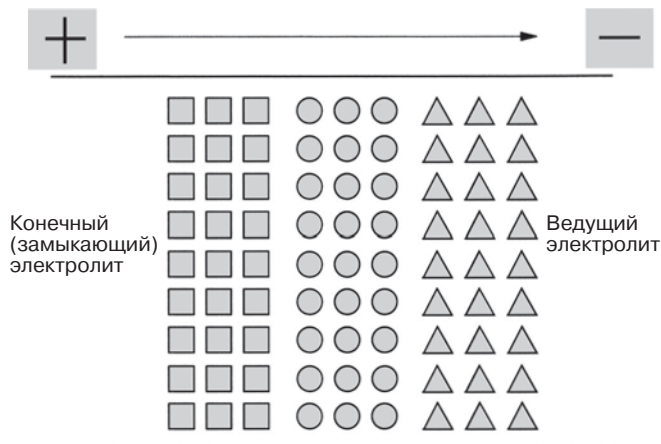


Рис. 7.16. Принцип капиллярного изотахофореза

ионов с наивысшей подвижностью. Этот феномен обуславливает очень четкие границы между отдельными зонами. Если анион диффундирует в соседнюю зону, его скорость изменяется, и он сразу возвращается обратно.

Следующий интересный аспект ИТФ — это постоянная концентрация в каждой зоне, которая определяется концентрацией ведущего электролита. Так как ИТФ проводятся обычно при постоянном токе, должно существовать постоянное соотношение между концентрацией и подвижностью ионов в каждой зоне. Зоны, которые сконцентрированы меньше (или сильнее), чем ведущий электролит, суживаются (или расширяются), чтобы достичь соответствующей концентрации.

Этот принцип можно с успехом применять для зонного концентрирования разбавленных проб. Благодаря эффекту концентрирования ИТФ обладает высокой чувствительностью при определении в пробе следовых количеств.

Так как концентрация веществ после разделения во всех зонах одинакова, в результате получается нетипичная по сравнению с традиционной хроматографией картина. Ширина зоны компонента прямо пропорциональна его количеству в анализируемой смеси. В результате получают не пики, а ступени. Высота ступеней дает в итоге качественную информацию о виде разделенного вещества, в то время как ширина зон пропорциональна количеству вещества, что дает в итоге количественную информацию. Ширину зон можно варьировать, изменяя концентрацию ведущих ионов.

Наконец, капилляр можно наполнять пробой примерно на 30–50%, чтобы все еще получать хорошие разделения. Благодаря особому механизму разделения в этом методе не возникает проблем даже при наличии большого избытка неионных компонентов в матрице. Изотахофорезу следует отдать предпочтение перед другими электрофоретическими методами, если ионные компоненты нужно определять в комплексных матрицах. Трудности возникают только при выборе подходящего буфера с подходящей подвижностью и величиной рН. Кроме того, в одном эксперименте могут определяться либо только анионы, либо только кати-

оны. Капиллярный изотахофорез используется для разделения неорганических ионов, органических кислот и оснований, нуклеотидов, аминокислот, пептидов, белков, наркотиков или средств защиты растений [7.22].

7.4. Оборудование

Прибор для капиллярного электрофореза состоит из аналитического устройства с разделительным капилляром, автодозатором и детектором и персонального компьютера, через который задаются все параметры и управляют отдельными процессами [7.23]. Принципиальная схема оборудования для ВЭКЭ показана на рис. 7.17.

Анализ происходит в несколько стадий:

- 1) удаление резервуара с буфером и перемещение конца капилляра в сосуд с пробой,
- 2) ввод пробы в капилляр либо под давлением, либо под действием электрического поля,
- 3) установка резервуара с новым буфером,
- 4) подача напряжения для разделения веществ,
- 5) по прошествии определенного времени разделенные зоны пробы проходят оптическое окно на капилляре, где происходит спектроскопическое детектирование.

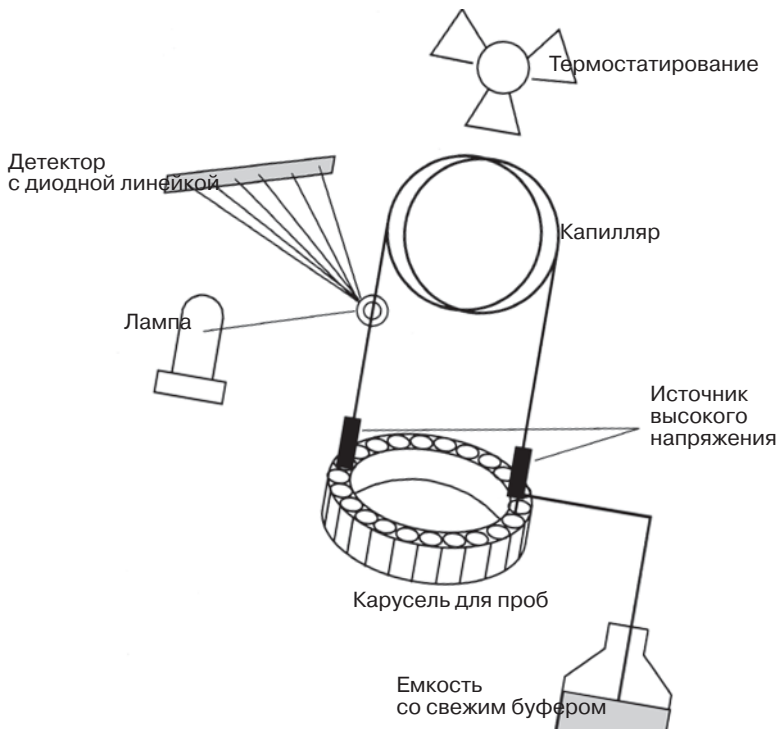


Рис. 7.17. Схема прибора для ВЭКЭ

Отдельные рабочие этапы показывают, что для рутинной работы разумно использовать соответствующим образом автоматизированный прибор. Отдельные составные части для ввода пробы, разделения, детектирования и набора элюентов описаны ниже.

7.4.1. Ввод пробы

Условием эффективности анализа является количественный и воспроизводимый ввод пробы. В ВЭКЭ, чтобы достичь высокой эффективности разделения, необходим ничтожно малый объем пробы в области нанолитров. Это, конечно, обусловлено малым диаметром используемых капилляров. При этом длина зоны пробы в капилляре более критична, чем ее объем. Основным правилом является то, что зона пробы не должна превышать 1–2% общей длины капилляра. Отсюда следует, что длина зоны пробы, в зависимости от длины и сечения капилляра, составляет несколько миллиметров, соответственно, от 1 до 50 нл. Это является преимуществом метода, если в распоряжении имеется лишь небольшой объем пробы, так как всего 5 мкл достаточно для многих анализов. К недостаткам следует отнести то, что из-за небольшого количества пробы снижается чувствительность детектора.

Сегодня используются методы ввода пробы как с помощью электромиграции, так и с помощью градиента давления, сформированного вдоль капилляра, как показано на рис. 7.18. В обоих случаях введенные объемы проб, в общем, не известны, но могут быть вычислены. Вместо объема приводятся рассчитываемые величины давления и времени для гидродинамического ввода или напряжения и времени для электрокинетического ввода.

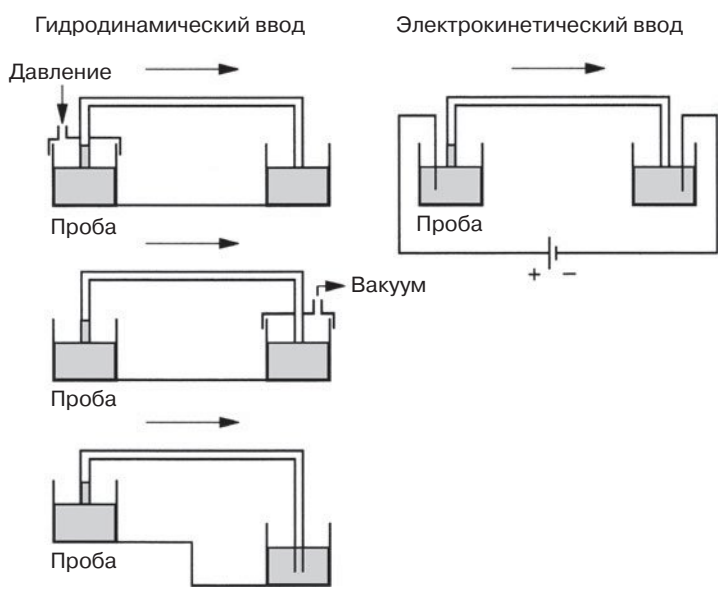


Рис. 7.18. Методы ввода пробы

7.4.1.1. Гидродинамический ввод

Гидродинамический ввод пробы используют наиболее часто. Для этого можно приложить давление к инъекционному концу, вакуум к противоположному концу капилляра или использовать сифонный эффект, приподняв резервуар со стороны ввода.

При гидродинамическом вводе пробы введенное количество пробы почти не зависит от матрицы пробы. Введенный объем пробы является функцией размеров капилляра, вязкости буфера, приложенного давления и времени. Объем V по закону Хагена—Пуазейля может быть выражен следующим образом:

$$V = \frac{\Delta P d^4 \pi t}{128 \eta L},$$

где ΔP — перепад давления на капилляре; d — внутренний диаметр капилляра; η — вязкость буфера; L — длина капилляра.

Типичное давление ввода изменяется от 25 до 100 мбар, время ввода пробы лежит в области от 0,5 до 5 с. Например, используя давление 50 мбар при времени 1 с в капилляре с диаметром 50 мкм, вводят пробу объемом 1,0 нл.

При всасывающей или сифонной технике разница давлений ΔP выражается как:

$$\Delta P = \rho g \Delta h,$$

где ρ — плотность буфера; g — ускорение свободного падения; Δh — перепад высоты между резервуарами.

Для сифонного ввода типичный перепад высоты составляет примерно 5–10 см и время ввода от 10 до 30 с. Течение за счет силы тяжести или сифонного эффекта затруднено. Силы поверхностного натяжения между жидкой пробой и стенками капилляра могут привести к неизвестному распределению уровней жидкости. То же самое происходит также при всасывании жидкости. Этим эффектом можно пренебречь только, если отношение объема жидкости к вытесняемому объему достаточно велико и если перепад высот во времени является известным и постоянным. Кроме того, этот метод не дает возможности на практике вводить точный объем жидкости в течение длительного времени в длинный капилляр или капилляр с малым диаметром, так как требуется большой перепад высот уровней жидкости.

При использовании вакуума или давления они могут быть точно измерены и поддерживаться при использовании одного насоса. Это требует системы контроля с датчиками и модулем управления. Недостатком вакуумной техники является, во-первых, ограниченный градиент давления, который может быть получен, а во-вторых, под вакуумом в капилляре могут образоваться пузырьки. Эти пузырьки ведут к нарушению электрического поля в процессе электрофореза и могут, вероятно, быть причиной прекращения тока в системе.

С инструментальной точки зрения воспроизводимость ввода может характеризоваться отклонением меньше, чем 1–2%. Точный контроль температуры ($\pm 0,1$ °C) необходим для постоянного объема ввода пробы, так как вязкость буфера и, вме-

сте с тем, вводимое количество изменяются на 2–3% на °С. При этом вязкость пробы не оказывает большого влияния на объем ввода, так как проба занимает лишь небольшую часть общего объема капилляра [7.24].

7.4.1.2. Электрокинетический ввод

При электрокинетическом вводе резервуар для буфера со стороны конца капилляра, в который вводят пробу, заменяется на резервуар с пробой, и к капилляру прикладывается напряжение. Это электрическое поле в 3–5 раз меньше, чем поле при электрофоретическом разделении. При этом проба продвигается в капилляр как за счет миграции, так и за счет действия ЭОП. Отличительной чертой электрокинетического ввода является то, что вводимое количество зависит от электрофоретической подвижности каждого компонента. Отсюда возникает дискриминация заряженных частиц, так как более подвижные ионы проходят в капилляр дальше, чем менее подвижные [7.25].

Вводимое количество Q рассчитывается следующим образом:

$$Q = \frac{(\mu_c - \mu_{\text{EOF}}) V \pi r^2 C t}{L},$$

где μ_c – электрофоретическая подвижность пробы; μ_{EOF} – скорость ЭОП; V – приложенное напряжение; C – концентрация пробы; t – время; L – длина капилляра.

Отсюда следует, что объем пробы зависит от ЭОП, концентрации пробы и подвижности компонентов пробы. Изменения проводимости, которые вызываются эффектами матрицы, такие как большие количества неизвестных ионов, например, NaCl, изменяют омическое падение напряжения на капилляре и, вместе с тем, объем ввода пробы. Из-за этого явления воспроизводимость электрокинетического ввода принципиально хуже, чем гидродинамического.

Несмотря на количественные ограничения электрокинетический ввод, тем не менее, проводить очень просто, так как не нужно никакого дополнительного оборудования. Этот метод подходит в случае анализа в вязких средах или гелях, где гидродинамический ввод неэффективен.

7.4.1.3. Методы концентрирования

Описано много методов концентрирования пробы в процессе или после ввода в капилляр для повышения чувствительности детектирования. Эти методы основываются на разнице силы поля между пробой и буфером и обозначаются как «концентрирование». Изотахорез является как раз таким методом. При ИТФ каждая мигрирующая зона обладает концентрацией ведущего буфера. Это свойство можно использовать для концентрирования пробы, соответствующим образом выбирая буфер.

Другой метод концентрирования основан на использовании буфера, чья проводимость значительно больше проводимости пробы. Прикладывая напряжение, создают большее электрическое поле в этой зоне, что вызывает более быструю миграцию ионов. Если ионы достигают зоны ведущего буфера, поле уменьшается, и ионы мигрируют медленнее. Это повторяется до тех пор, пока все области

пробы не сконцентрируются в узкие зоны. С этого момента электрическое поле во всех зонах будет однородным и начнется нормальный электрофорез.

Самый простой вид концентрирования заключается в разбавлении пробы водой или буфером с низкой проводимостью. Вводят, например, раствор с проводимостью в 100–1000 раз меньшей, чем у разделяющего буфера. В этом случае подходит гидродинамический или электрокинетический ввод. Концентрирование происходит тогда автоматически, причем за один раз можно достичь более чем 10-кратного обогащения.

7.4.2. Капилляр

Идеальный материал капилляра должен быть химически и электрически инертным, прозрачным в ультрафиолетовой и видимой областях, гибким, прочным и недорогим. Плавленый кварц по своим свойствам больше всего соответствует этим требованиям. Как и ГХ колонки, капилляры снабжены защитным покрытием из полиимида, который делает их гибкими и, таким образом, удобными в работе. Для детектирования оптическое окно легко можно сделать, удалив маленькую область полиимидного покрытия. Для этого несколько миллиметров полиимида расплавляют или соскабливают лезвием бритвы. Затем с капилляром нужно обращаться очень осторожно, так как капилляр без защитного покрытия становится в этом месте очень хрупким.

Другой материал для производства капилляров — это тефлон, который, однако, не так часто используется, как плавленый кварц. Тефлон прозрачен в ультрафиолете и не требует поэтому специального оптического окна. Хотя тефлон электронейтрален, наблюдается все же значительный ЭОП. Недостатком является то, что трудно получить равномерную внутреннюю поверхность тефлоновых капилляров. Существуют проблемы адсорбции пробы на внутренней стенке, кроме того, тефлон плохо отводит тепло. Это ограничивает использование тефлоновых капилляров.

Существуют капилляры из плавленого кварца с внутренними диаметрами от 10 до 200 мкм. Обычно используют капилляры с внутренним диаметром от 25 до 75 мкм с соответствующими наружными диаметрами от 350 до 400 мкм. Чтобы сократить время анализов, капилляр должен быть как можно короче. Длина изменяется от 10 см для наполненных гелем капилляров до 80 и 100 см при разделении сложных проб методом КЗЭ. Чаще всего используются капилляры с длиной от 50 до 75 см. Как правило, добавляется еще 5–15 см между детектором и резервуаром для слива.

7.4.2.1. Кондиционирование

Один из самых важных факторов хорошей воспроизводимости КЭ — это кондиционирование капилляра. Формирование воспроизводимой поверхности капилляра — это одна из самых больших проблем в ВЭКЭ. Условия были бы более воспроизводимы, если бы капилляр соприкасался только с буфером. Однако на практике это невозможно из-за адсорбции компонентов пробы и изменения ЭОП.

Чаще всего, чтобы удалять продукты адсорбции и обновлять поверхность депротонированием силанольных групп, применяется кондиционирование щелочами. Типичный цикл кондиционирования включает промывку 1 М NaOH, затем



0,1 М NaOH и, наконец, наполнение буферным раствором. Перед каждым анализом проводятся только два последних шага. Другой способ заключается в промывке сильной кислотой или органическими растворителями, такими как метанол, диметилсульфоксид или детергентами.

Щелочное кондиционирование не подходит при анализе с сильнокислыми буферными растворами, так как равновесие устанавливается очень долго. В нейтральной или щелочной области, напротив, поверхность уравнивается быстро и без проблем.

Следующим фактором поддержания однородной поверхности является адсорбция компонентов буфера. Например, если на поверхности адсорбируется фосфат, то нужно длительное время для установления равновесия. Кроме того, поверхностно-активные вещества могут вызывать постоянные изменения свойств поверхности капилляра. Поэтому для хорошей воспроизводимости нужно использовать отдельный капилляр для каждого ПАВ.

7.4.2.2. Термостатирование

Сильная зависимость объема ввода и времени миграции от вязкости обуславливает необходимость термостатирования с точностью $\pm 0,1$ °С с помощью воздушного или водяного термостата. Хотя термостатирование в жидкости теоретически более эффективно, воздушные потоки около 10 м/с подходят для тепловыделения в ВЭКЭ до 5 Вт/м. Воздушное термостатирование технически проще выполнимо, поэтому почти исключительно используют этот метод.

7.4.2.3. Высоковольтный источник тока

Для ВЭКЭ необходим источник постоянного тока с напряжением примерно 30 кВ и силами тока примерно от 200 до 300 мкА. Для хорошей воспроизводимости времени миграции колебания напряжения должны лежать в пределах $\pm 0,1\%$. Должна быть возможность менять полярность источника. При нормальных условиях ЭОП направлен в сторону катода. В этом случае ввод пробы осуществляют со стороны анода. Если, однако, ЭОП уменьшился, поменял направление или, как при использовании гелей, необходимо переполюсовать электроды, ввод пробы производится со стороны катода. Так как ориентацию (вход и выход) капилляра задает, все же, геометрия детектора, то должна быть возможность менять полярность источника.

Хотя большинство анализов проводится при постоянном напряжении, иногда выгодно работать при постоянном токе, например, в изотахофорезе или при невозможности хорошего термостатирования. Температурные колебания изменяют вязкость буфера и время миграции при работе с постоянным напряжением. При постоянном токе изменения вязкости компенсируются пропорциональными изменениями напряжения, вследствие чего достигают постоянных времен миграции.

7.4.3. Детектирование

Из-за малых размеров капилляра и связанного с этим незначительного количества пробы к детектированию в ВЭКЭ предъявляются особые требования. Хотя для КЭ нужен только нанолитровый объем проб, она, безусловно, не является

Таблица 7.3. Методы детектирования в КЭ

Метод	Пределы обнаружения	Преимущества/недостатки
Поглощение в УФ/видимой части спектра	10^{-5} – 10^{-8}	→ универсальный → диодная линейка позволяет получить спектр вещества
Флуоресценция	10^{-7} – 10^{-9}	→ чувствительный → в большинстве случаев требует дериватизации проб
Индукцированная лазером флуоресценция	10^{-14} – 10^{-16}	→ высокочувствительный → в большинстве случаев требует дериватизации проб
Амперометрия	10^{-10} – 10^{-11}	→ чувствительный → селективный, но только для электроактивных соединений
Проводимость	10^{-7} – 10^{-8}	→ универсальный → требует специальной электроники и модификации капилляра
Масс-спектрометрия	10^{-8} – 10^{-9}	→ чувствительный, дает информацию о структуре → дорогостоящий интерфейс между КЭ и МС
Косвенная УФ	–	→ универсальный → меньшая чувствительность чем в прямых методах

методом анализа в области следовых количеств, так как требует относительно концентрированных растворов пробы или методов предконцентрирования. Большинство методов детектирования очень похожи на методы жидкостной хроматографии. Как и в ВЭЖХ, наиболее часто используется УФ/Вид детектирование. В табл. 7.3 перечислены различные методы детектирования с соответствующими пределами обнаружения, а также с указанием их преимуществ и недостатков.

7.4.3.1. Поглощение в УФ- и видимой области

УФ/Вид поглощение – это наиболее широко используемый метод детектирования, что обусловлено универсальностью его использования. С капиллярами из плавленого кварца может использоваться область от < 200 нм вплоть до видимой области. Высокой эффективности достигают с помощью прямого детектирования на капилляре. Так как оптическое окно находится непосредственно на капилляре, удастся устранить мертвый объем, который является причиной уширения зон. На самом деле разделение происходит даже во время детектирования. Как и во всех оптических детекторах, ширина зоны детектирования должна быть мала по сравнению с шириной зоны элюирования, чтобы гарантировать высокое разрешение. Так как для ВЭКЭ характерны хроматографические зоны шириной от 2 до 5 мм, для получения безупречных пиков оптическое окно капилляра должно занимать максимум 1/3 этой ширины, т.е. примерно 1 мм.

Из-за маленького оптического пути вдоль круглого сечения капилляра дизайн детектора не критичен. Луч света должен быть очень хорошо сфокусирован в капилляре, чтобы получить максимальную световую отдачу и минимизировать рассеянный свет. Эти рекомендации важны как для чувствительности, так и для линейного диапазона детектирования. Коротковолновый свет лимитирует чувствительность детектирования в ВЭКЭ. Из-за круглой формы эффективная длина зоны детектирования меньше, чем внутренний диаметр капилляра, так как только часть света идет через центр капилляра.

Линейный диапазон детектирования ограничен преимущественно из-за светорассеяния за счет отражения от стенок капилляра. В идеальном случае весь свет должен был бы идти через центр капилляра, а не через стенки капилляра. Круглая форма капилляра обуславливает значительно меньший линейный диапазон детектирования в КЭ, чем в ВЭЖХ. В то время как в ВЭЖХ можно работать с величинами поглощения выше 1,0, при КЭ величина поглощения ограничена величиной около 0,5.

Существует связь между чувствительностью ультрафиолетового детектора и линейным диапазоном детектирования. Для данной конструкции прибора пределы детектирования можно улучшить, увеличивая проходящий поток света, например, повышая ширину щели. При этом уменьшается фоновый шум. Однако, с другой стороны, вследствие этого повышается доля рассеянного света, вследствие чего линейный диапазон детектирования уменьшается. Если, напротив, увеличивать щель вдоль длины капилляра, то уменьшается разрешающая способность детектора. В зависимости от постановки задачи либо чувствительность и разрешение, либо линейный диапазон детектирования можно оптимизировать вариацией размера щели. Эти соотношения представлены на рис. 7.19.

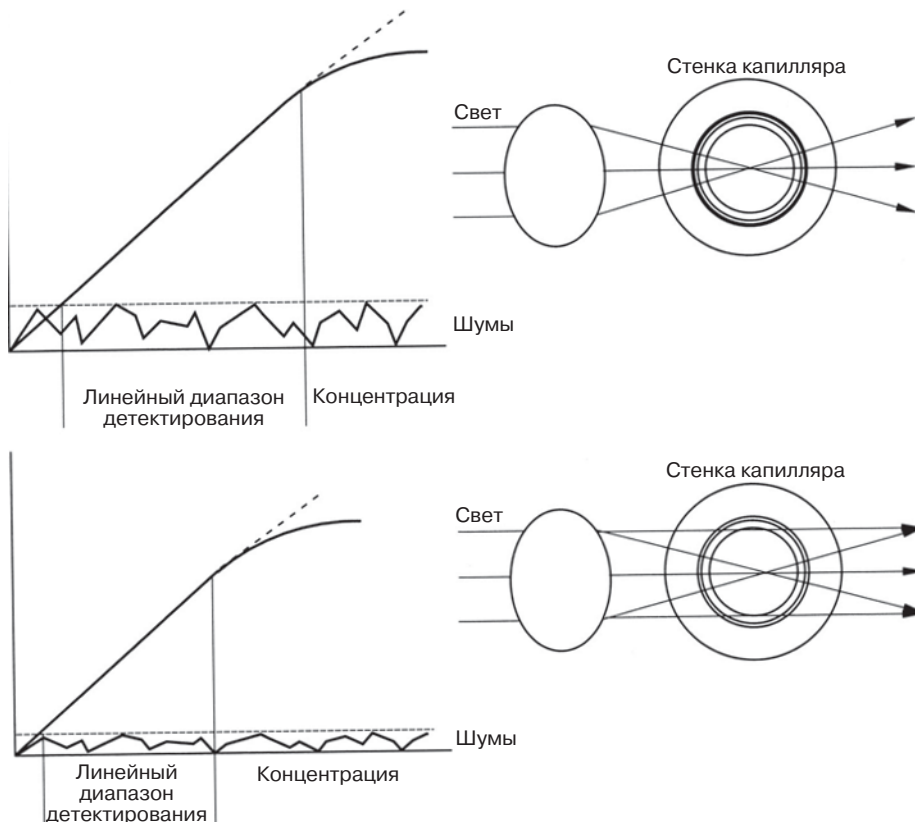


Рис. 7.19. Зависимость линейного диапазона детектирования и шумов от оптического пути в капилляре

Высокой чувствительности часто можно достичь в нижней ультрафиолетовой области. У пептидов и углеводов, например, нет сильных хромофорных групп, но их можно, тем не менее, успешно детектировать при длинах волн < 200 нм. При таких коротких длинах волн нужен буфер с минимальным собственным поглощением, чтобы фоновое поглощение оставалось малым, а вместе с тем уменьшался бы шум и увеличивался сигнал детектора. Для этого подходят фосфатные буферы и соли борной кислоты [7.26].

7.4.3.2. Примечания к количественному анализу

Количественное определение как по площади, так и по высоте пика в капиллярном электрофорезе является проблемой из-за плохой воспроизводимости площади пиков. Обычно в хорошо контролируемых условиях можно достичь результатов со стандартным отклонением менее 2%. Факторы, оказывающие основное влияния на площадь пиков, это:

- колебания температуры,
- адсорбция пробы,
- ввод малого объема пробы и
- интегрирование сигналов с низким соотношениями сигнал/шум.

Интересным аспектом количественного определения по площади пиков является различие скоростей миграции пробы. Это является противоположностью технике хроматографии, где все компоненты транспортируются с одинаковой скоростью, если находятся в подвижной фазе. В частности, при прохождении через детектор все компоненты при хроматографических разделениях перемещаются со скоростью подвижной фазы. Соответствующий по времени сигнал детектора дает в итоге отдельные пики.

В противоположность этому, в КЭ нужно учитывать скорости миграции отдельных веществ, так как разное время движения влияет на площадь пиков в детекторе.

Вещества с низкой подвижностью дольше находятся в окне детектора, чем компоненты с высокой подвижностью, и дают вместе с тем пики с большей площадью.

Этот феномен можно исправить посредством деления интегрированных площадей пиков на время миграции, как показано на рис. 7.20.

Оценка высот пиков в целом не так подходит для количественного анализа, как их площади. Основная проблема заключается в том, что высоты пиков зависят от предконцентрирования, которое происходит во время ввода пробы. Концентрирование может следовать просто из различий состава проб и буфера, т.е. из матричных эффектов, которые часто сложно определить. Кроме того, различия проводимости между пробой и буфером могут вести к асимметричным пикам, которые влияют на высоты пиков, но не их площади.

7.4.3.3. Капилляры с увеличением оптического пути

Согласно закону Ламберта–Бера чувствительность измерения поглощения может быть увеличена с помощью удлинения оптического пути в ячейке детектора.

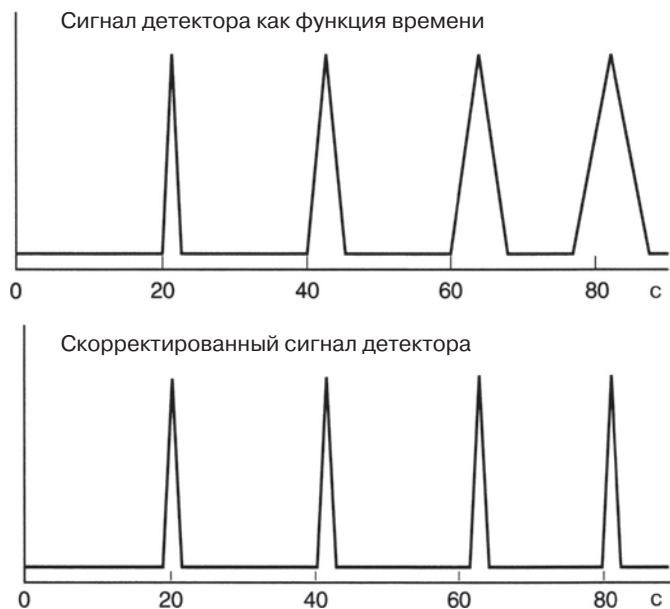


Рис. 7.20. Сигнал детектора как функция времени и сигнал, скорректированный по различной скорости миграции зон

Например, удвоение внутреннего диаметра капилляра ведет к двукратному увеличению поглощения. Однако эта возможность ограничена связанным с ней повышением электрической силы тока и, таким образом, с выделением тепла, которые возрастают пропорционально квадрату диаметра капилляра. Удвоение внутреннего диаметра вызывает четырехкратное увеличение тепловыделения.

Чувствительность измерения поглощения света можно увеличивать путем расширения капилляра только в области детектирования. Таким образом, можно увеличивать оптический путь без изменения размеров всего капилляра. Рис. 7.21 показывает схему расширенного в ячейке детектора капилляра, так называемую пузырьковую ячейку («Bubble cell»).

Пузырьковое расширение капилляра находится только в области детектирования, вследствие чего никакого увеличения силы тока не происходит. Особенности капиллярного электрофореза обуславливают, тем не менее, едва заметное

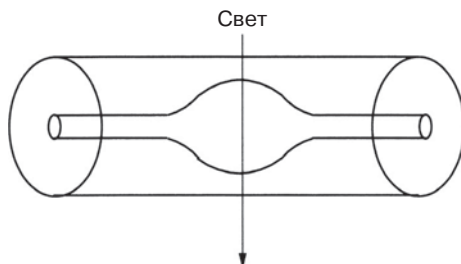


Рис. 7.21. Схематическое представление капилляра с увеличением оптического пути

уменьшение эффективности разделения и разрешения. В расширенной зоне электрическое сопротивление уменьшается, и, следовательно, уменьшается сила поля. Одновременно с увеличением объема сокращается скорость потока. Когда фронт зоны пробы попадает в пузырь, скорость ее движения уменьшается, и зона концентрируется. Так как зона пробы расширяется радиально (перпендикулярно к капилляру), то она концентрируется продольно (вдоль капилляра). Вследствие этого концентрация пробы остается постоянной, но длина оптического пути возрастает. Если, например, внутренний диаметр пузыря 150 мкм при диаметре капилляра 50 мкм, то фактор усиления оптического сигнала равен 3.

7.4.4. КЭ оборудование

Для разделяющей способности и воспроизводимости процесса очень важен выбор буфера, пробы и промывных растворов. В простых приборах для проведения анализа необходимо выполнить многочисленные этапы, которые рационально и воспроизводимо могут быть осуществлены только при автоматизированном исполнении. Поэтому коммерчески доступные устройства включают автоматический ввод пробы, коллектор фракций, систему для обновления буфера и систему для выравнивания уровня буферного раствора.

В ВЭКЭ у автоматического устройства ввода пробы есть две функции. Он должен транспортировать как емкости с пробой, так и емкости с буфером к концам капилляров. Для разработки метода обычно нужна одна емкость с анализируемой пробой и несколько емкостей с разными буферными смесями. Для рутинного анализа, наоборот, нужно много емкостей с пробами и лишь одна емкость с буферным раствором. Важно, что анодный и катодный резервуары содержат один и тот же буфер, так как иначе может произойти изменение тока и ЭОП.

Несмотря на то что при ВЭКЭ вводимый объем пробы очень мал, часто желательно собирать отдельные фракции для дальнейших исследований. Хотя можно собрать лишь пикограммовые количества проб, этого может быть достаточно для последующих анализов, например, с помощью ВЭКЭ в других условиях с другим буфером или других спектроскопических методов. Если после одного анализа в распоряжении недостаточное количество вещества, процесс можно неоднократно повторять автоматически.

Регулярное обновление буферных растворов также является важным условием хорошей воспроизводимости. Так как во время электролиза на катоде образуются ионы водорода, а на аноде гидроксил-анионы, то рН буфера может изменяться. Однако изменения величины рН влияют на электроосмотический поток.

Изменение величины рН зависит от емкости буфера и величины тока, а также от рабочего объема буфера. По этой причине необходимо регулярное обновление буфера. Это происходит автоматически опустошением буферного резервуара в сливной коллектор и его заполнением свежим буфером.

Поддержание одной и той же высоты уровня обоих буферных резервуаров необходимо как для эффективности, так и для воспроизводимости времен миграции. Если обе поверхности жидкости не находятся на одном и том же уровне, ламинарный поток перекрывается сифонным эффектом. Это влияние зависит от

диаметра и от длины капилляра, а также от вязкости буфера. Короткие капилляры с большим внутренним диаметром подвержены при этом наибольшему влиянию. Например, при изменении высоты на 2 мм между обоими резервуарами для 50 мкм капилляра время миграции изменяется на 2–3%, а для 100 мкм капилляра различие составляет уже 10%. Автоматическая система гарантирует, что поверхности жидкости в обоих резервуарах находятся на одном уровне, что устраняет сифонный эффект.

7.5. Значение ИХ и КЭ в ионном анализе

Ионная хроматография развилась в высокоэффективный метод определения как анионов, так и катионов. Для разнообразных задач в распоряжении имеется широкий выбор хроматографических колонок и детекторов. Ионная хроматография стала признанным методом инструментального анализа согласно различным нормам немецких промышленных стандартов (нем.: DIN), Международной организации по стандартизации (англ.: International Organization for Standardization, ISO), агентства защиты окружающей среды (англ.: Environmental Protection Agency, EPA) и Американского общества тестирования и материалов, организации, разрабатывающей и издающей стандарты для материалов, продуктов, систем и услуг (англ.: the American Society for Testing and Materials, ASTM).

Первоначально электрофорез использовался для разделения полимерных биомолекул, таких как пептиды, белки и аминокислоты, органических и неорганических соединений [7.27]. С развитием КЭ этот метод приобретает все большее значение для разделения неорганических анионов и катионов, а также низкомолекулярных органических ионов. Он вступает в конкуренцию с такими проверенными методами разделения, как ВЭЖХ или ИХ [7.28]. Преимуществом капиллярного электрофореза является большое число теоретических тарелок, высокая скорость, а также простота использования. Высокоэффективный капиллярный электрофорез (ВЭКЭ) – гораздо более быстрый и менее трудоемкий метод, чем классический гель-электрофорез и, кроме того, он может использоваться для комплексных проб, которые трудно разделить с помощью ИХ.

В то время как для ионной хроматографии существует большой ассортимент коммерчески доступных хроматографических колонок и методов детектирования, при капиллярном электрофорезе возможности выбора сегодня еще весьма ограничены. Для детектирования в распоряжении имеются только различные виды УФ/Вид- и флуоресцентной спектроскопии. Эти виды детектирования все же ограничивают диапазон применения этого метода, так как многие неорганические анионы и катионы не поглощают, как правило, ультрафиолетовый свет. Описанные сегодня в литературе пределы обнаружения в капиллярном электрофорезе были достигнуты в научно-исследовательских институтах с помощью специальных детекторов, которые еще не доступны коммерчески.

Для детектирования многих ионов, которые не поглощают в ультрафиолетовой области, необходимо вернуться к процессу косвенного УФ-детектирования, который был предложен для ионной хроматографии в начале восьмидесятых годов, но не получил широкого распространения [7.29]. Для этого в большинстве

случаев к электролиту добавляют ароматические карбоксикислоты, чтобы получить высокое поглощение в ультрафиолете. Если речь идет о флуоресцирующих соединениях, то может применяться флуоресцентный детектор.

В ионной хроматографии при выборе детекторов наблюдается обратное соотношение. В качестве универсального и высокочувствительного детектора здесь применяется детектор по электропроводности, в то время как УФ детектор имеет лишь второстепенное значение и часто применяется в комбинации с детектором по электропроводности. Более того, он применяется для ион-хроматографического определения переходных и тяжелых металлов после постколоночной дериватизации. При добавлении в систему детектирования модуля подавления проводимости возможен избирательный и очень чувствительный анализ ионов вплоть до области следовых количеств. Для определения электроактивных соединений применяют различные формы амперометрического детектирования.

Применение детектирования по электропроводности в капиллярном электрофорезе наталкивается на приборостроительные трудности, так как высокое напряжение вызывает сильный шум детектора. Из-за незначительных различий в проводимости между буфером и аналитом здесь необходима проверенная в ИХ техника подавления проводимости элюента. Эту проблему можно преодолеть, если разработать новые ионообменные мембраны в капиллярном масштабе. Вскоре будет коммерчески доступен детектор по электропроводности для анализа следов неорганических анионов и органических кислот вплоть до нижней ррб-области [7.30]. С помощью этого детектора можно ожидать значительного расширения области применения капиллярного электрофореза.

В то время как для ионной хроматографии на выбор предлагается множество хроматографических фаз с различной селективностью и емкостью, для капиллярного электрофореза, в принципе, существует только один вид хроматографических колонок, а именно: капилляры из кварца. На разделение можно влиять, варьируя используемый буфер. В капилляре под действием электрического поля при $pH > 6$ из-за диссоциации силанольных групп возникает электроосмотический поток, и его значение для анализа неорганических анионов уже было описано ранее [7.31].

В обычном капиллярном электрофорезе пробу вводят со стороны анода, а детектируют со стороны катода, таким образом, разделяя и определяя неорганические или органические катионы. Так как для разделения катионов нет необходимости модифицировать электроосмотический поток, можно использовать обычное оборудование с детектированием со стороны катода [7.32]. КЭ позволяет одновременный анализ щелочных металлов, ионов аммония, щелочно-земельных металлов, а также некоторых переходных и тяжелых металлов. Это не всегда возможно с помощью ИХ.

Однако для разделения некоторых катионов недостаточно только различий в индивидуальной электрофоретической подвижности. Таким образом, к примеру, для разделения ионов аммония и калия необходимо использование краун-эфиров. Для разделения переходных и тяжелых металлов к электролиту добавляют лимонную кислоту, которая образует равновесные комплексы. Для разделения катионов с помощью ионной хроматографии используют различные стационар-

Таблица 7.4. Сопоставление оценочных критериев КЭ и ИХ

Анион	КЭ		ИХ	
	Линейный диапазон, мг/л	Предел обнаружения, мкг/л	Линейный диапазон, мг/л	Предел обнаружения, мкг/л
Бромид	0,6–100	680	0,04–40	4
Хлорид	0,3–100	300	0,01–150	3
Сульфат	0,4–100	450	0,05–50	5
Нитрат	0,3–100	300	0,04–40	4

ные фазы, с помощью которых можно одновременно определять щелочные и щелочно-земельные металлы, включая ионы аммония, переходные и тяжелые металлы.

Для анализа неорганических анионов электроосмотический поток нужно обратить с помощью добавления к электролиту катионных поверхностно-активных веществ. Для этого хорошо подходит гидроксид гексаметония благодаря его хорошей растворимости в воде. Внутренняя стенка капилляра, покрытая катионным ПАВ, становится положительно заряженной, так что электроосмотический поток направляется к аноду. Если изменить также полярность приложенного электрического поля, анионы будут мигрировать в том же самом направлении, что и ЭОП. В этом случае детектирование проводят непосредственно перед анодом. В отличие от КЭ с непосредственным УФ детектированием, данный метод не дает возможности одновременно разделять анионы и катионы [7.33]. Как видно из табл. 7.4, чувствительность КЭ с существующим в данный момент методом детектирования меньше, чем у ионной хроматографии.

7.5.1. Примеры использования

На рис. 7.22 показан пример различий между ионной хроматографией и капиллярным электрофорезом при разделении различных анионов в пробах сточных вод. Наряду с различной последовательностью элюирования, вызванной различным механизмом разделения, капиллярный электрофорез является существенно более быстрым методом анализа, чем ионная хроматография.

Важным критерием для оценки метода является его линейный рабочий диапазон. Он в целом лучше для ионной хроматографии, чем для капиллярного электрофореза. Основное различие методов, тем не менее, состоит в различии в пределах обнаружения. Пределы обнаружения единственно возможным для капиллярного электрофореза методом прямого или косвенного УФ детектирования лежат значительно выше, чем для ионной хроматографии. С помощью ИХ с детектором по электропроводности и модулем подавления проводимости элюента чувствительность анализа достигает ppb-области даже без предконцентрирования.

Наряду с этим недостатком КЭ обладает тем огромным преимуществом, что справляется также с пробами в трудных матрицах, для которых меньше подходит ионная хроматография без пробоподготовки. Например, высокое содержание лаурилсульфата отрицательно сказывается на результатах ионной хроматографии

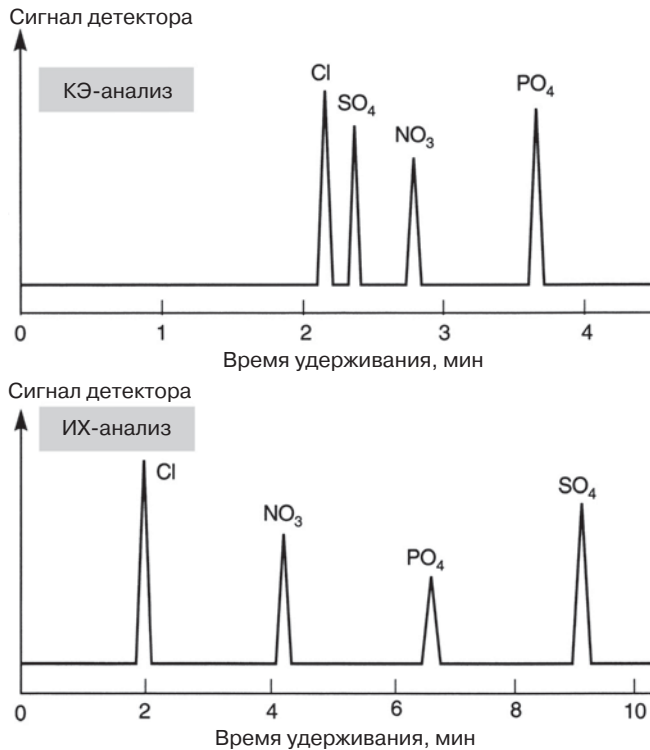


Рис. 7.22. Анализ анионов в сточных водах с помощью КЭ и ИХ

при определении ионных компонентов зубной пасты. С помощью капиллярного электрофореза, напротив, возможен безупречный анализ после отделения с помощью центрифугирования полирующих средств. Рис. 7.23 показывает электрофореграмму анионного и катионного анализа подготовленной таким образом пробы. В то время как определение анионов занимает 12 мин, для анализа катионов нужно лишь 3 мин.

Рис. 7.24 показывает электрофореграмму питьевой воды, откуда видно, что полный анализ щелочных и щелочно-земельных металлов, включая ионы аммония, также занимает 3 мин. Более того, КЭ можно успешно применять для непосредственного определения анионов в необработанном 25%-ном растворе гидразина. ИХ не дает такой возможности, так как гидразин может необратимо повредить стационарную фазу. Здесь необходима соответствующая пробоподготовка для понижения содержания гидразина перед ИХ-анализом.

Часто нужно определять следовые количества компонентов в растворах с высокой концентрацией соли. Вместе с тем, содержание определяемых ионов не должно опускаться ниже предела обнаружения, поэтому их нельзя существенно разбавлять. Для таких часто встречающихся на практике задач КЭ подходит меньше, так как перегрузка системы разделения происходит уже при концентрациях больше 100 мг/л, так что существует очевидное ограничение концентрации по ионам в целом.

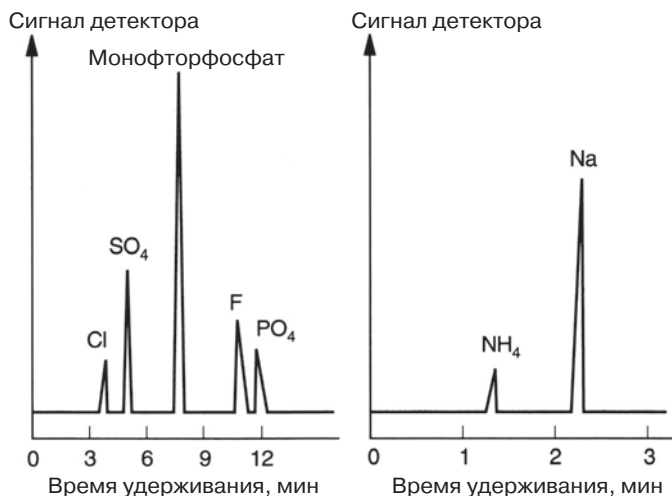


Рис. 7.23. Анализ неорганических анионов и катионов в зубной пасте

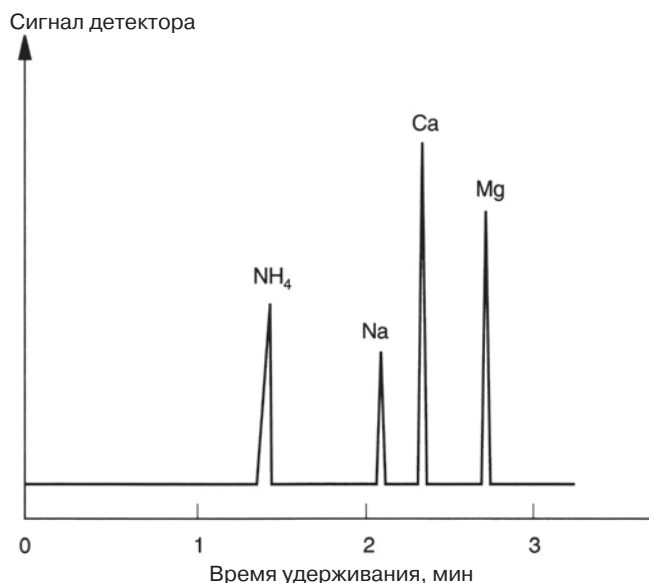


Рис. 7.24. Анализ неорганических катионов в питьевой воде

С помощью ионной хроматографии можно одновременно определять компоненты, присутствующие в пробе в следовых количествах и в очень высоких концентрациях. Для этого используется хроматографическая колонка с высокой емкостью вместо колонки с обыкновенной низкой емкостью. На такие колонки можно подавать концентрации до нескольких г/л, не теряя при этом разделяющей способности по отношению к примесям. Пример такого использования представлен на рис. 7.25 для определения хлорида и сульфата в чистом нитрате аммония.

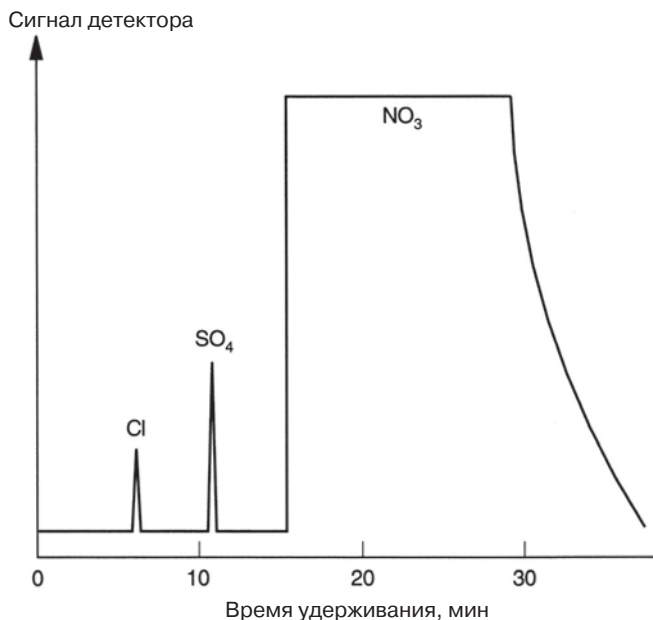


Рис. 7.25. Анализ ионной хроматографией хлорида и сульфата в растворе нитрата аммония

7.6. Выводы и перспективы

Капиллярный электрофорез объединяет разрешение обычного электрофореза с удобством применения и скоростью ВЭЖХ. Он дает сопоставимое с ГХ разрешение за более короткое время. КЭ показывает высокую эффективность разделения с незначительными приборостроительными издержками. Разделение происходит благодаря разнице скоростей электрофоретической миграции заряженных частиц в электрическом поле.

В настоящее время никакой другой метод разделения не развивается так быстро, как КЭ. Спустя годы научной эволюции и разработок коммерчески доступных приборов он достиг той ступени развития, где может быть необходимым инструментом анализа с высоким потенциалом для рутинных задач. Многие ученые уже занимаются разработкой специфических приложений, которые доказывают эффективность этого метода. Капиллярный электрофорез во многом заменит применение гель-электрофореза в трубках и на пластинках. Для этого он обладает многими преимуществами по сравнению с классическими методами, недостатками которых являются, прежде всего, неудовлетворительное количественное определение и трудность автоматизации.

Так как капиллярный электрофорез похож как на ВЭЖХ, так и на обычный электрофорез, то он вытеснит некоторые методы ВЭЖХ. Подобно ВЭЖХ для КЭ используют колонки с внутренними диаметрами от 50 до 100 мкм и длиной 0,1–1 м. Вместо насоса для движения частиц используют напряжение в несколько киловольт.



Финансовый оборот на рынке приборов для капиллярного электрофореза, обозначаемых также аббревиатурой ВЭКЭ (высокоэффективный капиллярный электрофорез), составлял в 1992 году во всем мире примерно 30 млн американских долларов, а на 1993 год прогнозировался прирост более чем 30%. Интерес к этому методу разделения чрезвычайно велик в США. Можно считать, что спустя 15 лет после первого описания и примерно через 8 лет после внедрения первого коммерческого устройства произошло признание этого метода.

Примерно 3000 приборов, которые проданы до сего дня во всем мире, наибольшее применение находят в промышленности. В университетах, если вообще используется КЭ, то, по причине высокой стоимости, применяют самодельные устройства, собранные из различных компонентов.

Распространению КЭ в фармацевтическом анализе до сих пор мешали технические проблемы воспроизводимости ввода крайне маленьких объемов. Эти проблемы в значительной степени решены, так что при количественном анализе ошибки составляют менее 2%. При работе с внутренними стандартами ошибки количественного определения составляют около 1%.

Также все лучше понимают причины значительных колебаний времен миграции. Тщательным и стандартизованным промыванием капилляров между отдельными анализами белков достигают очень хорошей воспроизводимости результатов анализа. Беспрецедентная эффективность разделения, связанная с короткими временами анализов, благоприятствует продвижению КЭ в аналитике водорастворимых соединений.

7.6.1. Капилляры

Так как при анализах методом капиллярного электрофореза отчетливо проявляется явление электроосмоса, то тип капилляра влияет на разделение. В большинстве случаев используются необработанные кварцевые капилляры. Продукты разных производителей отличаются по свойствам поверхностей, особенно по плотности силанольных групп на поверхности, так что величины электроосмотического потока сильно различаются не только между капиллярами различных производителей, но и между различными партиями капилляров одного и того же производителя.

Однако следует ожидать, что производители капилляров из кварца учитывают эти новые требования, изменят условия производства капилляров для стандартизации их внутренней поверхности.

Стабильность капилляров с модифицированной поверхностью все еще является предметом горячих дискуссий. Модификация поверхности способствует как лучшему контролю электроосмотического потока (ЭОП), так и уменьшению адсорбции – особенно белков – на стенке капилляров, что всегда сопровождается большой потерей эффективности. Преимущества и недостатки химически модифицированных капилляров еще активно обсуждаются. Последние наряду с выгодной ценой обеспечивают также более простое использование и возможность регенерации капилляра с помощью промывания. Модификацию можно проводить просто с помощью добавления буфера или предварительного промывания.

Полимерные добавки часто так сильно адсорбируются на стенке капилляра, что не смываются при замене буфера.

Химически модифицированные капилляры относительно стабильны при низких величинах рН, однако при рН более 8 их стабильность падает. Нет доказательств того, что при покрытии капилляров слоем акриламида поверхностные связи силан – кварц разрушаются. Некоторые признаки указывают на то, что скорее гидролизуется акриламид. Капилляры с замещенными по азоту акриламидами проявляют более высокую рН стабильность, чем с незамещенными. Для капилляров с термически иммобилизованным поливиниловым спиртом при нейтральных рН для белков удалось достичь числа теоретических тарелок, превышающего миллион, что почти соответствует теоретически возможному пределу для полых колонок.

Для капиллярного электрофореза теперь используются исключительно «жидкие гели», которые могут легко меняться в капилляре. ЭОП в этих капиллярах должен быть подавлен, а сами гели должны быть электронейтральны. Гель должен оставаться стабильным во время разделения в капилляре для достижения наивысшей эффективности. Наряду с «линейным» полиакриламидом для уменьшения диффузии проб применяются производные агарозы, гидроксипропилцеллюлоза и аналогичные водорастворимые полимеры. Замещение капилляров из кварца пластмассовыми капиллярами (полыми волокнами) может открыть новые интересные варианты применения метода.

7.6.2. Детектирование

Детектирование в капиллярном электрофорезе все еще является самой большой проблемой. Хотя были описаны методы, позволяющие иметь границу обнаружения вплоть до отдельных молекул, все же при этом речь идет о дорогостоящих и трудоемких методах, которые не подходят для рутинного анализа. Сегодня коммерчески доступно лишь непосредственное или косвенное детектирование на основе поглощения света в области УФ/Вид. Для улучшения чувствительности определения капилляры расширяют в месте детектирования. Потеря эффективности разделения минимальна, выигрыш в чувствительности соответствует закону Ламберта–Бера. Наряду с решением аппаратурных проблем применяются также эффекты фокусировки, причем вновь привлекает внимание метод изотахофореза. Было показано, что капилляр можно наполнять раствором пробы до половины и затем сжать эту зону с помощью правильно выбранных ведущего и замыкающего электролитов.

Без труда пробу можно сконцентрировать примерно в сто раз. С помощью стандартных ультрафиолетовых детекторов можно определить 10^{-9} моль вещества. Разумеется, этот метод позволяет обогащать не все пробы. Проблемы всегда возникают в случае биологических проб с высоким содержанием соли. С помощью флуоресценции, индуцированной лазером, удается понизить границу обнаружения примерно на 3–4 порядка, но цена лазеров допускает рутинное применение только приборов, у которых длины волны возбуждения находятся в видимом диапазоне. Это требует проведения предварительной дериватизации пробы.



Косвенные методы детектирования в КЭ сопряжены с гораздо меньшим количеством проблем, чем в ВЭЖХ или ИХ, так как обязательный системный пик появляется только в области ЭОП, где отсутствуют ионы пробы. Граница определения катионов и анионов лежит в верхней ррб-области. При использовании косвенной флуоресценции ионы щелочных металлов можно определять в нижней ррб-области.

Для капиллярного электрофореза применяются также комбинированные методы. Для комбинирования КЭ/МС подходит, прежде всего, метод ионизации электрораспылением, при котором особенно хорошо удается переход ионов из жидкой фазы в газообразную. Границы определения в случае узких капилляров опускаются до области аттомолей. Разумеется, высокие требования предъявляются к необходимому интерфейсу, причем рабочий буфер для КЭ должен также соответствовать условиям МС анализа.

7.6.3. Приложения

Капиллярный электрофорез уже нашел свое место в анализе как одноцепочечной, так и двухцепочечной ДНК, причем для этого используются исключительно капилляры со сменными гелями. Определение молекулярного веса белков возможно с помощью додецилсульфата натрия и гель-электрофореза. Больше нет необходимости в окрашивании геля, и нужно обращать внимание только на то, чтобы матрица геля была еще достаточно оптически прозрачна при низких длинах волн (при 210 нм), чтобы обеспечить чувствительное детектирование. Лазерное индуцированное флуоресцентное детектирование позволяет использование КЭ в геномном анализе.

При использовании химически модифицированных капилляров без ЭОП также можно проводить изоэлектрофокусировку. После того как разделение произошло, система либо гидростатически выдавливается в детектор, либо белки снова осаждаются благодаря высокой концентрации соли (NaCl).

КЭ также успешно применяется в области углеводного анализа. После дериватизации флуоресцентными реактивами удается определять следовые количества углеводных молекул. Также можно анализировать олигосахариды с более чем 100 мономерными остатками в цепи. Для анализа полисахаридов подходят капилляры, наполненные гелем.

Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ) позволяет разделять также незаряженные соединения. Выбором подходящих мицеллообразующих веществ можно оптимизировать разделения в МЭКХ таким образом, что будет доступна широкая область селективностей. С помощью мицелл в КЭ можно вводить гидрофобные компоненты. Однако проба должна быть в определенной мере водорастворима, хотя уже описывались разделения посредством КЭ в полярных органических растворителях (например, N,N'-диметилформамиде).

Преимущества имеют полимерные мицеллообразователи. С полиакрилатами критическая концентрация мицеллообразования практически равна нулю, так как сама макромолекула образует мицеллу. Вследствие этого получают распределительную систему, которая не зависит от температуры и концентрации соли. Изби-

рательность можно оптимизировать применением двух разных мицеллообразующих агентов в широкой области. Примером служит применение резоркаренов и суспензий хроматографических частиц в качестве псевдостационарных фаз.

Благодаря хиральным молекулам, например, в форме дериватов аминокислот, возможно также разделение энантиомеров. Гораздо большего успеха здесь достигли, однако, циклодекстрины и его производные, которые позволяют разделение множество энантиомеров.

Благодаря большому числу теоретических тарелок, которое можно достичь также и в МЭКХ, в КЭ удается проводить разделения с относительно низкими величинами селективности. Для повышения селективности в случае заряженных циклодекстринов наряду с включением можно также использовать образование ионных пар [7.34].

Сегодня сильной стороной ВЭКЭ являются анализ и контроль качества биопродуктов. Интересные варианты применения получаются при сочетании КЭ с ВЭЖХ, так как оба метода разделения основываются на различных физических принципах. Функцию предварительного разделения выполняет ВЭЖХ, а ВЭКЭ служит для контроля чистоты. Таким образом, можно полностью автоматизировать контроль качества биопродуктов с помощью двух разных методов разделения. В области клинического анализа, где также проводится уже много электрофоретических исследований, капиллярный электрофорез используется как легкий в обслуживании автоматического метода анализа. В частности, возможность получать количественные анализы с наименьшими физиологическими препаратами, вплоть до одной клетки, открывает новые области для его применения.

Еще несколько лет назад разделение олигонуклеотидов в наполненных гелем капиллярах оценивалось как самый важный метод разделения, в то время как сегодня внимание все больше и больше направляется на малые ионные соединения. Быстрый рост производительности детекторов – прежде всего, возможность записывать ультрафиолетовые спектры, – а также метод определения не поглощающих в ультрафиолете ионов с помощью косвенного детектирования делают интересным использование метода во многих областях анализа. Вряд ли какой-либо другой метод разделения позволяет работать с более разнообразными пробами в таком широком количественном диапазоне. Наряду с коротким временем анализов и высокой степенью автоматизации крайне невысокие материальные затраты также говорят, наверное, в пользу применения КЭ в рутинной и исследовательской работе.

Между тем, после решения проблем точности ввода пробы и воспроизводимости разделений КЭ начнет по-настоящему конкурировать с ионной хроматографией, так как в одном капилляре после замены буфера могут анализироваться и катионы и анионы. Так как в КЭ неорганических ионов в настоящее время еще нужно использовать косвенную УФ детекцию, то неизбежны ограничения метода, обусловленные динамическим диапазоном и меньшей чувствительностью этого метода детектирования. Быстрая перегрузка капилляра также затрудняет использование этого метода для одновременного определения ионов в широком диапазоне концентраций.

7.6.4. Новые направления

Основное преимущество КЭ состоит в миниатюризации несмотря на то, что первоначально ввод пробы и манипуляция с малыми объемами были причинами плохой воспроизводимости, что делало метод неприемлемым. Однако у малых объемов пробы есть свои преимущества. При дальнейшем уменьшении размеров вводимых проб появится возможность анализировать содержание отдельной клетки и проводить реакции с объемами от 10 до 100 пл.

Ферментативные анализы можно проводить в капиллярах. Пробу, содержащую фермент, вводят в капилляр, который наполнен соответствующим субстратом. Разделение проводят как обычно, только время от времени выключая ток, перед тем как фермент дойдет до детектора, чтобы запустить реакцию. Продукты возникают в капилляре, соответственно там, где субстрат преобразуется в ходе ферментативной реакции. После повторного включения тока продукты реакции транспортируются к детектору. Электрофореграмма отражает активность фермента вдоль капилляра. Этот высокоспецифичный и чувствительный метод называют электрофоретически опосредованным микроанализом (англ.: *Electrophoretically mediated micro analysis*, ЕММА).

Пожалуй, самого важного ограничения КЭ, причиной которого является применение не оптимального для ионных соединений метода детектирования, можно избежать внедрением детектирования по электропроводности. Если удастся миниатюризировать надежный метод подавления электропроводности элюента до необходимого для капиллярной техники масштаба, то область ионного анализа обогатится высокоэффективным методом с новыми возможностями для определения неорганических и органических ионов. В следующие годы начнется стремительное распространение и совершенствование новой техники анализов.

ГЛАВА 8

СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Хроматография со сверхкритическими подвижными фазами (англ.: Supercritical fluid chromatography, СКФХ) известна еще с 1962 года [8.1], но существенный прогресс произошел лишь в 1982 году после внедрения фирмами Hewlett Packard и Dionex коммерческих приборов. СКФХ использует подвижные фазы за пределами специфической для вещества критической температуры и критического давления. Сверхкритические флюиды — это газы с повышенной плотностью и свойствами, которые находятся между свойствами газов при высоком давлении и свойствами жидкостей. Это означает, что многие физические свойства элюентов, такие как плотность, вязкость и коэффициент диффузии, лежат между величинами, характерными для газов и жидкостей. В соответствии с этим СКФХ может быть полезна там, где аналитическую проблему не может решить только газовая или только жидкостная хроматография. Речь идет, прежде всего, о термолабильных веществах, для которых из-за низкой летучести не пригодна ГХ.

Напротив, в сравнении с ВЭЖХ в глаза бросаются, прежде всего, универсальные возможности детектирования в СКФХ. Простота соединения с ГХ детекторами обеспечивает чувствительную детекцию. При этом вряд ли возникают проблемы вредности подвижных фаз и, соответственно, утилизации отходов. СКФХ — это действительно быстрый метод разделения, обладающий хорошим разрешением. В качестве хроматографических колонок используются как наполненные колонки, так и полые капиллярные. Чтобы поддерживать подвижную фазу в сверхкритическом состоянии, требуется как повышенная температура, так и повышенное давление, для чего разработаны специальные хроматографы.

8.1. Физические основы

СКФХ отличается от других методов колоночной хроматографии, таких как ГХ и ВЭЖХ, агрегатным состоянием используемых подвижных фаз. Они находятся в сверхкритическом состоянии, т.е. они не являются ни газами, ни жидкостями. СКФХ заполняет, таким образом, нишу между газовой и жидкостной хроматографией. Вещество называется сверхкритическим флюидом, когда находится при температуре настолько высокой, что его нельзя больше перевести в жидкое состояние повышением давления. Самая низкая температура, характеризующая этот переход, является критической температурой T_c . Чтобы избежать трудности разграничения с газовой хроматографией, добавляют, что вещество также находится под давлением выше критического давления p_c . T_c и p_c — это специфические для вещества константы.

8.1.1. Что такое сверхкритический флюид?

При нормальных условиях, то есть при атмосферном давлении и температуре $20\text{ }^\circ\text{C}$, мы имеем дело в большинстве случаев с твердыми, жидкими или газообразными веществами, но не со сверхкритическим флюидом. Впервые сверхкритическое состояние вещества наблюдал в 1822 году Каньяр де ла Тур (Caignar de la Tour). Первые систематические исследования провел в 1869 году Эндрю (Andrews) на примере двуокиси углерода.

Если наполнить химическим соединением, например, двуокисью углерода, сосуд, в котором можно свободно варьировать давление и температуру, то можно получать отдельные агрегатные состояния вещества. Двуокись углерода как твердый сухой лед существует при температурах меньше $-78\text{ }^\circ\text{C}$ и атмосферном давлении, при более высоких температурах и атмосферном давлении – это газ. Двуокись углерода испаряется, поэтому при атмосферном давлении не образуется никакой жидкой фазы. Только при повышении давления можно сжижать CO_2 . Путем изменения температуры и давления можно устанавливать различные соотношения объемов между жидкой фазой и находящимся над ней паровым пространством. На границе между газовой и жидкой фазами образуется мениск.

Диаграмма фаз двуокиси углерода представлена на рис. 8.1. При повышении температуры и давления граница раздела фаз исчезает, например, для CO_2 это происходит при температуре выше $31,1\text{ }^\circ\text{C}$ и давлении больше $p = 7,37\text{ МПа}$.

Для получения сверхкритического состояния необходимы условия, превышающие как критическую температуру T_c , так и критическое давление p_c .

В то время как в тройной точке t_p на диаграмме фаз одновременно сосуществуют три агрегатных состояния вещества (твердый/жидкий/газообразный), а вдоль линии раздела фаз – два (твердый/жидкий, твердый/газообразный, жид-

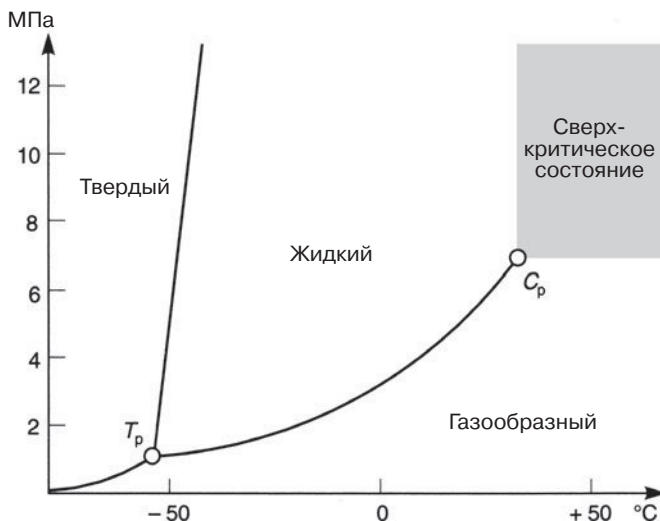


Рис. 8.1. p - T диаграмма для CO_2

кий/газообразный), в критической точке c_p существует только одно состояние, которое как раз и представляет собой сверхкритическое состояние. Если двигаться из сверхкритической области вдоль изотерм к более низким давлениям, то попадают в область газообразного агрегатного состояния, не пересекая при этом границ раздела фаз. Непрерывное изменение свойств наблюдается также при переходе в жидкое состояние, если перемещаться вдоль изобар в область более низких температур. Физический смысл критического состояния состоит в том, что путем изменения давления и температуры можно свободно переходить от жидкого состояния к газообразному и наоборот, т.е. свойства вещества – в данном случае подвижной фазы – изменяются здесь непрерывно.

8.1.2. Свойства сверхкритического флюида

Сверхкритические флюиды обладают свойствами газов и жидкостей, они сжимаемы, как газы, так что, изменяя давление, можно регулировать их плотность. Кроме того, у сверхкритических флюидов есть текучесть, которая может быть как сравнима по величине с текучестью жидкостей, так и меньше или значительно больше. Сверхкритический аммиак или сверхкритическая вода ($T_c = 374,1$ °C и $p_c = 22,04$ МПа) обладает настолько большой растворяющей способностью, что может растворять даже стекло. Существенно более инертная, но и менее полярная сверхкритическая двуокись углерода находит, поэтому, больше приложений. Еще одним преимуществом CO_2 является низкая критическая температура.

Наряду с физическими качествами преимуществами двуокиси углерода являются низкая цена и незначительная токсичность, а также возможность получения флюида высокой чистоты.

8.1.3. Сверхкритический флюид как подвижная фаза

СКФХ – это мост между газовой и жидкостной хроматографией. Это проявляется также в важных для хроматографии физических качествах подвижной фазы при том, что сверхкритические флюиды находятся между газами и жидкостями [8.2]. Величины, характеризующие физические свойства этих трех состояний, указаны в табл. 8.1.

Коэффициент диффузии, плотность и вязкость подвижной фазы оказывают влияние на хроматографическое разделение.

ВЛИЯНИЕ КОЭФФИЦИЕНТА ДИФфуЗИИ

Большие коэффициенты диффузии (т.е. быстрая диффузия) способствуют хорошей кинетике обмена анализируемых компонентов между стационарной и подвижной фазами. Это дает узкие пики и, тем самым, эффективное разделение.

Таблица 8.1. Сравнение физических свойств газов, сверхкритических флюидов и жидкостей

Физическая величина	ГХ	СКФХ	ЖХ
Коэффициент диффузии cm^2/s	10^{-1}	$10^{-3}-10^{-4}$	$< 10^{-5}$
Плотность g/cm^3	10^{-3}	0,1–1	0,6–1,4
Вязкость $g/cm\ c$	10^{-4}	$10^{-3}-10^{-4}$	10^{-2}



ВЛИЯНИЕ ПЛОТНОСТИ

Высокая плотность позволяет растворять компоненты пробы в подвижной фазе. Из этого следует, что в СКФХ не нужно проводить испарение жидкой пробы, как это типично для ГХ. Сольватирующая способность и, вместе с тем, способность растворять пробы сильно зависят от плотности флюида и при тех плотностях, которые используются в СКФХ, находятся ниже, чем у жидких растворителей, но гораздо выше, чем у газов при низких давлениях, которые практически не являются растворителями.

ВЛИЯНИЕ ВЯЗКОСТИ

Низкая вязкость делает возможным как применение длинных капиллярных колонок, так и использование наполненных колонок без излишне большого перепада давления. Вязкость флюидов при повышенной плотности ближе к вязкости газов, в то время как коэффициент диффузии и при более высоких плотностях больше соответствует коэффициенту диффузии жидкостей.

Повышенный коэффициент диффузии и пониженная вязкость обеспечивают то, что с помощью сверхкритических флюидов в качестве подвижной фазы в СКФХ хроматографическое разделение проводится быстрее, чем с жидкими фазами в ВЭЖХ. Тем не менее, в ходе дальнейшего повышения давления в области плотностей, близких к плотности жидкостей, сольватация становится максимальной, но преимущество более высоких коэффициентов диффузии по большей части нивелируется.

8.2. Оборудование

Хотя хроматография в сверхкритических флюидах известна уже более 25 лет, широкое применение и развитие метода начались лишь относительно недавно. Причиной этого являлась высокая стоимость оборудования, тем более что внимание концентрировалось сначала на бурном развитии ВЭЖХ. Кроме того, для производства аппаратуры СКФХ в начальный период нужно было собственное производство. Сегодня имеется ряд поставщиков, которые предлагают на рынке целые системы для СКФХ.

В СКФХ используют оборудование, составленное из конструктивных элементов как ГХ, так и ВЭЖХ. Подвижная фаза под необходимым давлением подается насосами с длинным ходом поршня, которые работают по принципу шприца. В качестве системы ввода пробы используют многоходовые краны для ВЭЖХ с небольшой внутренней петлей. Колоночный термостат заимствован у газового хроматографа. В качестве детектора в большинстве случаев применяется ПИД.

Самый важный параметр в СКФХ – это плотность подвижной фазы, которая может устанавливаться как функция давления и температуры. Насосом и термостатом, управляет, как правило, персональный компьютер. Повышения плотности можно достичь как повышением давления, так и снижением температуры. Из-за большей зависимости плотности от давления изменение давления более эффективно для изменения плотности по сравнению с изменением температуры.

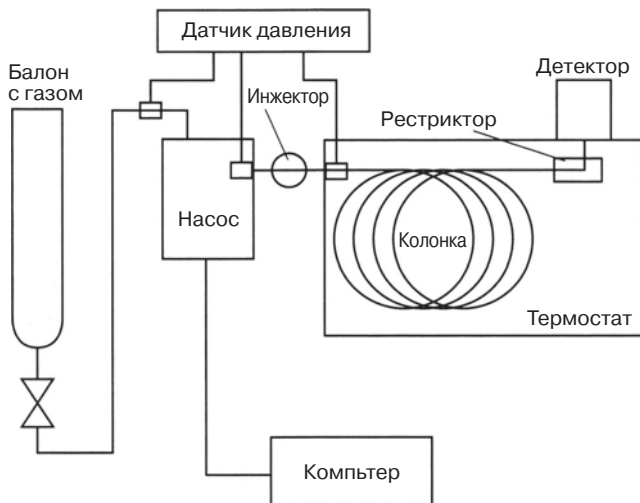


Рис. 8.2. Схема прибора для СКФХ

Изменяя оба параметра, можно влиять на распределение компонентов между стационарной и подвижной фазами и, тем самым, изменять удерживание.

На рис. 8.2 представлено схематическое изображение устройства сверхкритического флюидного хроматографа. Наряду с обычными элементами хроматографических систем существенной частью СКФХ аппаратуры является рестриктор (ограничитель). Здесь речь идет о находящемся в конце колонки капилляре, или прецизионном клапане. Задачей рестриктора является обеспечение необходимого минимального давления для достижения сверхкритического состояния до конца колонки. Особенно в капиллярных колонках с очень маленькими скоростями потока требуется ограничение в конце колонки, чтобы поддерживать сверхкритические условия в системе, чтобы, в свою очередь, устанавливать поток и, таким образом, управлять удерживанием.

8.2.1. Градиенты

Большие различия в физико-химических свойствах компонентов пробы дают соответственно большой разброс во времени удерживания. В газовой хроматографии этого избегают с помощью программирования температуры термостата, в жидкостной хроматографии – благодаря использованию градиентного элюирования. СКФХ также работает с градиентами. Возможностей программировать физические параметры подвижной фазы и, таким образом, влиять на разделение в СКФХ больше, чем в ГХ и ВЭЖХ. Несколько возможностей создания градиентов указаны в табл. 8.2.

Таблица 8.2. Градиенты, наиболее часто применяемые в СФХ

Простые градиенты	Составные градиенты
Плотность и давление	Давление или плотность и температура
Температура	Состав флюида и температура
Состав бинарной подвижной фазы	Давление или плотность и линейная скорость

Градиент плотности подвижной фазы в СКФХ соответствует градиенту температуры в ГХ или градиенту полярности в ВЭЖХ.

Самые частые виды градиентного программирования в СКФХ – это линейное повышение давления, линейное повышение плотности, асимптотическое, т.е. экспоненциальное повышение плотности, понижение температуры, а также их комбинации. Необходимые для этого кривые изменения давления и температуры можно рассчитывать с помощью подключенного к системе компьютера. Это возможно несмотря на нелинейные функциональные зависимости, если в компьютер занесена p - T -зависимость для соответствующей подвижной фазы [8.3].

Градиенты плотности и градиенты давления стали стандартной процедурой в СКФХ [8.4]. Отрицательная температурная программа (т.е. не повышение, а снижение температуры) при постоянном давлении ведет к увеличению плотности подвижной сверхкритической фазы и, вместе с тем, как правило, к более быстрому элюированию.

Градиентное элюирование путем изменения состава и вместе с тем полярности подвижной фазы регулярно применяется в жидкостной хроматографии, чтобы повысить в подвижной фазе долю компонента, обладающего лучшей растворяющей способностью, и тем ускорить элюирование. Запрограммированное повышение доли компонента в СКФХ также ведет к похожим результатам. Отличие от программирования плотности состоит в том, что вещества, которые не могут быть элюированы или элюируются только с большим трудом с помощью программирования плотности флюида, вплоть до значений близких к плотности жидкости, могут элюироваться при наличии в элюенте компонента, обладающего лучшей растворяющей способностью.

8.3. Подвижные и стационарные фазы

В качестве подвижной фазы в СКФХ используются только такие соединения, для которых не слишком сложно достичь сверхкритического состояния, то есть критическое давление и критическая температура не должны быть слишком высоки. Сверхкритическая вода в качестве мобильной фазы наряду с близкой к экстремальной растворяющей способностью, что создает приборостроительные трудности, обладает физическими данными, которые делают ее не пригодной для использования в качестве подвижной фазы. Выбор применяемых в СКФХ подвижных фаз дан в табл. 8.3.

Таблица 8.3. Примеры мобильных фаз для СФХ

Подвижная фаза	T_c (°C)	p_c (МПа)	Плотность (г/см ³)	Детектор
CO ₂	31,050	7,370	0,470	ПИД, УФ, МС
C ₃ H ₈	96,800	4,260	0,230	УФ, МС
C ₅ H ₁₂	196,500	4,220	0,240	УФ, МС
CHF ₃	23,0	4,810	0,520	УФ
Хе	16,600	5,830	1,110	ПИД, УФ, МС
NH ₃	132,400	11,270	0,240	ПИД, УФ, МС

Из неорганических и органических веществ чаще всего используется CO_2 . Причиной этого является низкая цена, инертность, нетоксичность, хорошая растворяющая способность и возможность применения различных детекторов, включая ПИД. Алифатические углеводороды как, например, пентан, также часто используются, в то время как фторированные углеводороды — редко. Ксенон и другие более тяжелые благородные газы дороги и должны рассматриваться в настоящее время в качестве экзотических элюентов, которые лишь в редких случаях встречаются в СКФХ.

Иначе обстоит дело с аммиаком, хотя о его хроматографических свойствах из-за его агрессивности, в том числе по отношению к полисилоксановым фазам в капиллярных колонках и к уплотняющим материалам, до сих пор было еще довольно мало сообщений. Тем не менее, это одна из немногих высокополярных фаз, перспективных для СКФХ после преодоления этих проблем. Другие высокополярные соединения, такие как галогенводородные кислоты, алкилбромиды и высшие оксиды азота, из-за крайней агрессивности, нестабильности и физиологического действия меньше подходят для СКФС или не годятся совсем.

Разработка специальных стационарных фаз для СКФХ еще только предстоит. Используемые в СКФХ стационарные фазы для наполненных колонок и капиллярных колонок соответствуют стационарным фазам, которые применяются в ГХ и ВЭЖХ. Это немодифицированный или химически модифицированный силикагель, т.е. пришедшие из ВЭЖХ нормально- и обращеннофазовые материалы. Также могут использоваться такие полимеры, как полисилоксан, которые в ГХ служат как покрытие в капиллярных колонках или для нанесения на частицы носителя. Благодаря использованию колонок для ВЭЖХ добиваются большей избирательности и высокой разделяющей способности, которая сравнима с газовой хроматографией. Несколько колонок могут объединяться в серию, так как падение давления на колонке со сверхкритическим элюентом существенно ниже, чем с жидкими элюентами.

Поскольку диффузионный пробег в наполненных колонках меньше, то разделения на них, при прочих равных условиях, могут быть проведены либо быстрее, либо с более высоким разрешением, чем на полых капиллярных колонках. С другой стороны, меньший диаметр каналов между частицами наполненной колонки ведет к существенно большему перепаду давления на единицу длины колонки. Этот перепад давления ограничивает длину колонки, которая существенна для разделения, в то время как в капиллярных колонках это случается только при очень больших длинах или очень маленьких диаметрах. Таким образом, наполненные колонки имеют относительно короткую длину от 5 до 25 см, в то время как обычная длина капиллярных колонок составляет от 5 до 20 м.

8.4. Детекторы

Для СКФХ применяются как обыкновенные газохроматографические детекторы, так и детекторы для жидкостной хроматографии. Преимущество СКФХ по сравнению с ВЭЖХ состоит в том, что с некоторыми подвижными фазами, например, CO_2 , можно использовать чувствительный ПИД, который реагирует на



все вещества, которые сгорают в пламени горелки. Применение этого детектора в ВЭЖХ невозможно из-за использования жидких подвижных фаз.

Так как недостатком наиболее часто применяемой подвижной фазы CO_2 является ее незначительная полярность, то на практике в СКФХ в элюент в качестве основных или дополнительных составляющих часто должны быть введены органические подвижные фазы. Кроме того, добавлением полярных растворителей можно улучшить недостаточную растворяющую способность элюента. В качестве модификаторов находят применение метанол, ацетон, гексан и хлористый метилен. В этих случаях ПИД уже нельзя применять, поскольку он реагирует на органические соединения.

ПИД как универсальный детектор, а также родственные ему другие пламенные детекторы из газовой хроматографии применяются только в сочетании с капиллярными колонками. Для наполненных колонок используются преимущественно детекторы для ВЭЖХ, в частности, УФ-ВИД детектор. СКФХ как с капиллярными, так и с набивными колонками имеет право на существование. Практические соображения относительно имеющихся в распоряжении детекторов позволяют использовать ГХ детекторы в капиллярной СКФХ и ВЭЖХ детекторы в СКФХ с наполненными колонками. ГХ детекторы не допускают присутствия больших концентраций растворителей в качестве модификаторов. Применение больших количеств модификаторов для существенного изменения полярности допускается в системах с наполненными колонками и детекторами для ВЭЖХ.

Универсальный детектор для СКФХ и ВЭЖХ – это масс-спектрометр (МС), который уже сейчас успешно применяется для СКФХ. Преимущества комбинированной техники СКФХ-МС основаны по существу на более легком удалении подвижной фазы и, вследствие этого, более легком отделении субстрата в устройстве ввода пробы у масс-спектрометра. Высококипящие подвижные фазы ВЭЖХ труднее испарять и одновременно выделить без дискриминации подлежащую детектированию смесь веществ [8.5].

В то время как объединение ВЭЖХ с ^1H -ЯМР трудно осуществимо и, в большинстве случаев, возможно только при использовании дейтерированных растворителей, ЯМР является идеальным методом в сверхкритической флюидной хроматографии с применением CO_2 , так как при этом в ^1H -спектре не появляются никакие фоновые сигналы. Даже при необходимых для СКФХ высоких температурах и давлениях могут быть получены безупречные спектры, которые показывают то же самое разрешение, как и спектры, полученные для растворов [8.6].

8.5. Сравнение СКФХ с ГХ и ВЭЖХ

Сравнение различных методов разделения по их хроматографической эффективности предполагает, что анализируемые вещества в принципе могут быть элюированы. Если это возможно, то преимуществом обладает газовая хроматография из-за ее высокой эффективности разделения, скорости анализа и универсального детектирования. Так как в ГХ массоперенос происходит в газовой фазе, то неизбежно возникают все же ограничения из-за летучести и термостабильности веществ.

Эти проблемы могут быть вызваны полярностью соединений или их молекулярным весом. По этой причине в ГХ часто необходима дериватизация пробы, чтобы гарантировать ее достаточную летучесть.

Так как в жидкостной хроматографии растворимость веществ является решающим фактором для возможности их элюирования, то доступную для разделения группу веществ можно значительно расширить за счет выбора подходящих элюентов. Поэтому ВЭЖХ и в настоящее время является альтернативой ГХ, так как она имеет то преимущество, что обладает высокой растворяющей способностью при незначительном термическом воздействии. Тем не менее, два ограничения метода ВЭЖХ не могут остаться неупомянными.

С одной стороны, разделения в ВЭЖХ ограничены по числу теоретических тарелок. С другой стороны, проблемы возникают в области детектирования. Хотя колонки ВЭЖХ и обладают высокой эффективностью разделения по числу теоретических тарелок на метр длины, абсолютное число теоретических тарелок ограничено длиной разделительной колонки, которую нельзя безгранично увеличивать из-за перепада давления на колонке.

С другой стороны, недостаток ВЭЖХ состоит в том, что чувствительное обнаружение гарантировано только в том случае, если вещества обладают хорошо детектируемыми функциональными группами. Здесь для хромофоров имеется прежде всего УФ детектирование, а для электроактивных групп, соответственно – амперометрическое детектирование.

Сверхкритические флюиды обладают рядом физических свойств, которые положительно отражаются на их использовании в качестве подвижных фаз. К ним принадлежит, прежде всего, высокая, как у жидкостей плотность, а также большие, чем у жидкости, коэффициенты диффузии и более низкая вязкость. Многие обычные для СКФХ элюенты позволяют проводить анализы при низких температурах, а также использовать большинство детекторов из ГХ и ВЭЖХ.

Очень упрощенно можно сказать:

СКФХ комбинирует хроматографические процессы, которые похожи на жидкостную хроматографию с возможностями детектирования газовой хроматографии.

По сравнению с ГХ преимущество состоит в том, что можно работать с более низкими температурами. Исходя из критической температуры CO_2 , нижняя граница для СКФХ лежит при 32°C , а на практике типичные величины лежат между 80 и 120°C . Это позволяет проводить хроматографическое разделение также термически неустойчивых соединений. Так как испарение при вводе пробы не требуется, то возможны также анализы высокомолекулярных соединений, которые нельзя перевести в паровую фазу. Пробы растворяются в сверхкритической фазе.

По сравнению с ВЭЖХ СКФХ дает то преимущество, что благодаря использованию ПИД в качестве детектора возможно обнаружение молекул не имеющих УФ поглощающих групп, однако при том условии, что CO_2 будет использоваться без добавления органического модификатора. На основе несколько лучшей диффузии у сверхкритических фаз процесс разделения занимает меньшее время.

В заключение этого сравнения СКФХ с ГХ и ВЭЖХ следует подчеркнуть, что СКФХ не может заменить традиционные хроматографические методы. Эффективность, легкие условия анализов и универсальные возможности детектирования делают СКФХ ценным и, возможно, необходимым дополнением к ГХ и ВЭЖХ.

8.6. Применение

СКФХ из-за более высоких технических издержек не так широко распространена в лабораториях, как традиционные методы газовой и жидкостной хроматографии. Тем не менее, она закрывает пробел в методах хроматографического разделения соединений, для которых ГХ и ВЭЖХ малопригодны. Соединения, для анализа которых сверхкритическая флюидная хроматография действительно обладает преимуществами, можно разделить на четыре группы:

- термически неустойчивые соединения,
- сильнолетучие соединения,
- реакционноспособные вещества и
- соединения без хромофоров или электроактивных групп.

Термически неустойчивые соединения можно анализировать уже при температурах немного выше комнатной температуры, если используются подвижные фазы с низкими критическими температурами, как, например CO_2 , (критическая температура — 31°C). Одновременно растворяющая способность сверхкритического флюида окажется настолько высокой, что для хроматографического анализа становятся доступны также и нелетучие вещества. Как раз двуокись углерода, но также и многие другие флюиды в СКФХ являются химически инертными и позволяют, таким образом, анализ таких активных веществ, как, например, изоцианаты. Благодаря использованию универсальных детекторов решаются все те проблемы анализов, когда необходимо определять вещества без хромофорных, электроактивных или других специфически детектируемых групп.

СКФХ вместе с тем представляет альтернативу высокотемпературной газовой хроматографии для определения высококипящих или нелетучих соединений. Используя растворяющую способность сверхкритической подвижной фазы, СКФХ со сверхкритической двуокисью углерода может анализировать углеводороды с числом атомов углерода 120 при температуре колонки не выше 140°C . При этом не существует опасности, что произойдет термическое разложение, изомеризация или полимеризация, как при ВТГХ.

8.6.1. Полимеры

Многие из вышеупомянутых особенностей часто наблюдаются при анализе олигомеров и полимеров. Из-за высоких молекулярных весов их анализ методом ГХ в большинстве случаев невозможен. Выше определенной температуры многие полимеры неустойчивы и распадаются с образованием мономеров и низкомолекулярных фрагментов. При этом в качестве альтернативы можно вернуться к пиролитической ГХ.

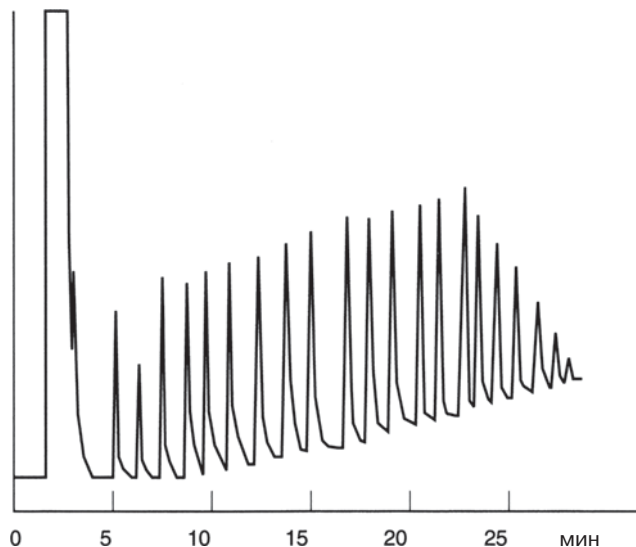


Рис. 8.3. СКФХ-хроматограмма полиэфирного олигомера

Отсутствие специфически детектируемых функциональных групп часто препятствует анализу высокомолекулярных соединений методом ЖХ. Поскольку полимеры распространены очень широко, то проблема их анализа встречается почти в каждой крупной аналитической лаборатории.

Если использовать двуокись углерода в качестве элюента и ПИД в качестве детектора, то хроматографически можно проанализировать составные части пробы с молекулярным весом примерно до 10 000 Da. Эта граница в большинстве случаев достаточна для анализа полиэтиленгликолей (ПЭГ). Эти неионные поверхностно-активные вещества получают в результате реакции спирта с этиленоксидом и/или пропиленоксидом. Так как на практике в большинстве случаев на выходе получают не индивидуальные вещества, а смесь продуктов, то состав реакционной смеси, соответственно, достаточно сложен. Рис. 8.3 показывает СКФХ хроматограмму продуктов реакции додеканола и тетрадеканола с этиленоксидом. Здесь в противоположность ВЭЖХ детектирование с ПИД возможно без какой-либо предварительной дериватизации.

8.6.2. Мономеры

Наряду с олигомерами и полимерами с помощью СКФХ можно анализировать также молекулы, составляющие основу полимеров, — мономеры. При этом, по сравнению с ГХ, преимуществом является, прежде всего, возможность проведения анализов при низких температурах. Наряду с успешным анализом акриловых и метакриловых мономеров большую роль играет анализ изоцианатов. Их активность по отношению к воде, спирту и похожим элюентам часто делает невозможным ЖХ анализ. Однако мономеры изоцианатов могут хроматироваться в инертных условиях с двуокисью углерода в качестве флюида, причем нужно избегать любого вида теплового воздействия.

8.6.3. Пестициды

В области аналитики пестицидов и гербицидов применение сверхкритической флюидной хроматографии также часто имеет преимущество. Многие из этих активных веществ неустойчивы при нагревании, относительно полярны и сложно детектируемы. Одновременно наблюдается интерес к анализу не только самого активного вещества, но и его метаболитов. На рис. 8.4 показано разделение альдикарба –

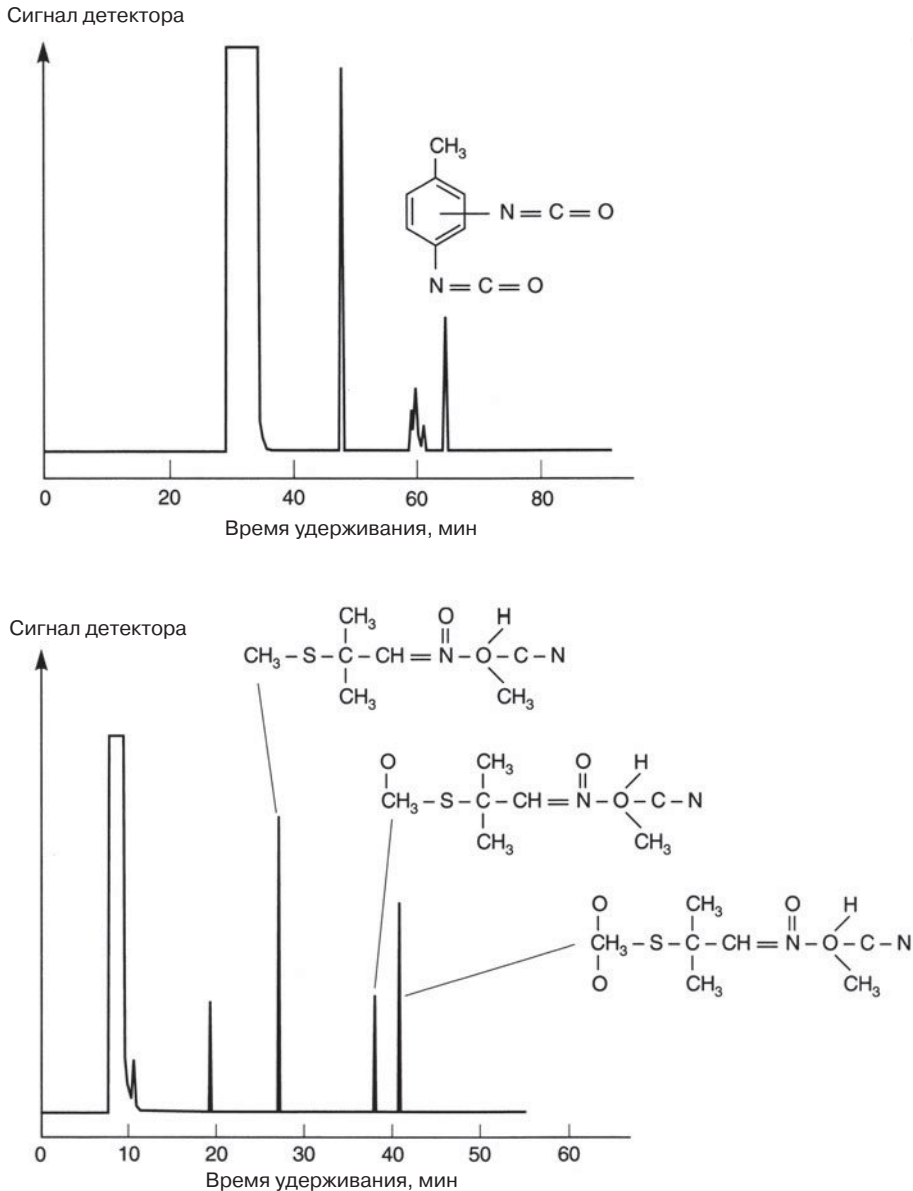


Рис. 8.4. Примеры СКФХ-разделений;верху толуилндиизоцианат, внизу – альдикарб и метаболиты

пестицида, содержащего один остаток мочевины и одну тиоэфирную группу, и его метаболитов, которые содержат сульфоксидную или сульфогруппу. Для анализа этой сложной матрицы особенно подходит применение детектора, селективного к азоту и фосфору (АФД). Наряду с более высокой избирательностью этот детектор также и более чувствителен, чем ПИД.

8.7. Сверхкритическая флюидная экстракция

Самой большая затрата времени в производственных и экологических лабораториях происходит при подготовке проб, которая одновременно является также самой восприимчивой к ошибкам частью анализа. Лишь изредка пробы могут вводиться в хроматографические системы непосредственно, без предварительной подготовки, т.е. отделения мешающих матричных компонентов или обогащения определяемых соединений. Требуемые много времени, производимые вручную и, вместе с тем, также дорогие методы подготовки проб, такие как дистилляция, экстракция в аппарате Сокслета и препаративная колоночная хроматография – это современное состояние техники анализа и составная DIN-, ASTM- или EPA-протоколов.

Экстракция продолжительностью до 20 час. необходима для извлечения в аппарате Сокслета добавок из полимеров или экологически значимых соединений из наземных проб, чтобы достичь максимальной степени экстракции. За длительное время экстракции ответственны коэффициенты диффузии жидких экстрагентов, так как экстрагируемые составные части пробы должны растворяться и диффундировать из матрицы в экстрагент.

Использование сверхкритического флюида как экстрагирующего средства может сократить время экстракции от 5 до 100 раз, так как сверхкритического флюида выше примерно в 10–100 раз, чем коэффициенты диффузии жидкостей (ср. табл. 8.1). Близкая к жидкостям растворяющая способность сверхкритического флюида – вместе с его вязкостью, близкой к вязкости газа, – позволяет эффективно экстрагировать пробы за доли времени, необходимого при экстракции жидкостью.

Если в качестве сверхкритических флюидов применяется двуокись углерода или закись азота N_2O , которые газообразны при атмосферном давлении и комнатной температуре, то экстрагент может легко и быстро отделяться от пробы при атмосферном давлении. Это является еще одним преимуществом экстракции флюидом в дополнение к скорости подготовки проб. Много экстракций, которые требуют часов или дней при работе вручную, могут быть выполнены за время от нескольких минут до максимум одного часа в автоматическом флюидном экстракторе [8.7].

Уже очень давно экстракции со сверхкритическими флюидами (в частности, CO_2) применяются в промышленности. В качестве примера можно упомянуть декофеинизацию кофе 1970 года (фирма Hag), а также экстракцию хмеля (от пиперина) и экстракцию табака (от никотина). Сверхкритической флюидной экстракцией (СКФЭ) с неядовитой и экологически безопасной сверхкритической двуокисью углерода можно заменять экстракцию токсичными органическими растворителями, такими как дихлорметан или бензол. Это значительно сокращает риск для персонала лаборатории и окружающей среды.

Сверхкритическое состояние характеризуется тем, что незначительные изменения давления и/или температуры вызывают значительные изменения плотности. Вследствие этого плотность сверхкритического флюида может варьироваться между плотностью газа ($\rho = 10^{-3}$ г/см³) и жидкости ($\rho = 1$ г/см³). Важно, что релевантные для экстракции физические свойства плотность, коэффициент диффузии и вязкость лежат у флюида между свойствами газа и жидкости. Растворимость коррелирует с плотностью, а скорость, с которой устанавливается равновесие, коррелирует с коэффициентами диффузии, причем в последнем случае более предпочтительны возможно большие величины.

Если рассматривать фазовую диаграмму, приведенную на рис. 8.1, то ниже критической точки при изменении температуры или давления есть переход фаз, который характеризуется внезапным изменением упомянутых выше свойств. Критическое состояние характеризуется как раз тем, что в области фазовой диаграммы выше критической точки никакое скачкообразное изменение этих параметров уже не встречается. Плотность, вязкость и коэффициенты диффузии изменяются с изменением давления и/или температуры плавно от величин, характерных для газа вплоть до величин, характерных для жидкости.

Так как растворяющая способность сверхкритических флюидов зависит от их плотности, она может быть «установлена» выбором давления и температуры. Низкая плотность и, таким образом, низкая растворяющая способность связаны с низким давлением. Высокое давление обуславливает высокую плотность и большую растворяющую способность. Таким образом, путем многократной экстракции, при которой давление каждый раз скачкообразно повышается, можно достичь

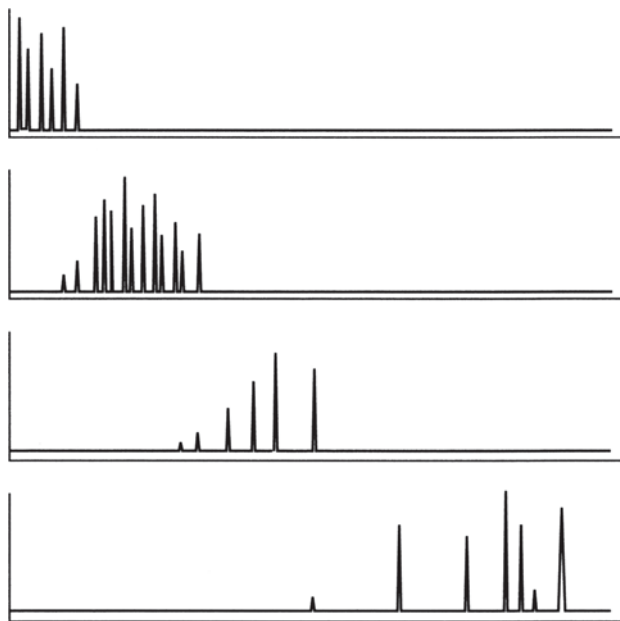


Рис. 8.5. ГХ хроматограммы четырех фракций необработанного масла, полученного методом СКФЭ

фракционирования компонентов пробы. Рис. 8.5 показывает фракционирование на примере пробы минерального масла. Примечательно, что наблюдается лишь незначительное перекрывание отдельных фракций, что подтверждает возможность селективной экстракции.

Температура влияет и на растворяющую способность и на массоперенос. Если повышать температуру при постоянном давлении, последует понижение плотности и вместе с тем уменьшение растворяющей способности. При постоянной плотности повышение температуры вызывает повышение растворяющей способности. В зависимости от того, рассматривают ли влияние температуры при постоянной плотности или при постоянном давлении, повышение температуры может объяснить увеличение или уменьшение растворяющей способности флюида. Этот феномен в литературе часто ведет к путанице, если не ясно, изменяется ли температура при постоянном давлении или при постоянной плотности.

Наряду с растворяющей способностью температура влияет на коэффициенты диффузии, и повышение температуры вызывает их увеличение [8.8]. Так как транспорт экстрагируемых компонентов пробы из матрицы происходит в результате диффузии, то время экстракции может снижаться при более высоких температурах. Если увеличивают температуру экстракции, то нужно также повышать давление, чтобы поддерживать желаемую растворяющую способность для компонентов пробы. Для CO_2 в сверхкритическом состоянии можно выделить фактически две области, которые находят применение в сверхкритической флюидной экстракции (табл. 8.4).

Таблица 8.4. Параметры типичного рабочего диапазона CO_2 для СКФХ

Диапазон	Температура	Давление	Плотность	Коэффициент диффузии
Высокая плотность	40 °С	200 атм	0,8 г/см ³	10 ⁻⁴ см ² /с
Низкая плотность	100 °С	80 атм	0,15 г/см ³	10 ⁻⁵ см ² /с

Областью полной экстракции является область высокой плотности, в то время как в области низкой плотности происходит селективная экстракция. Селективная экстракция используется, например, для пряностей, ароматических веществ и вытяжек ароматических масел. Максимальная температура экстракции зависит от максимального давления, допустимого для используемого флюидного экстрактора, и от термической стабильности экстрагируемых компонентов пробы. При этом полезная область температур для сверхкритической флюидной экстракции с двуокисью углерода лежит между 35 °С и 200 °С. Растворяющая способность может модифицироваться добавлением других флюидов [8.9].

8.7.1. Оборудование

Для проведения сверхкритических флюидных экстракций необходимы прочные экстракционные емкости, в которые помещается проба. Система насосов служит для подачи экстрагирующего растворителя и создания необходимого давления в экстракторе. Сами экстракторы помещаются в термостаты, в которых устанавливается заданная температура экстракции. За экстракторами находится элемент, в котором сверхкритический флюид переводится в газ. Для этого могут применять-

ся клапаны или рестрикторы. Затем экстракты концентрируются в приемниках (оффлайн-СКФЭ) или в специальном модуле для хроматографии (онлайн-СКФЭ). Интересно, что коммерческий вариант онлайн-комбинации СКФЭ с СКФХ и ГХ был впервые введен в 1987 году. Оффлайн-приборы стали коммерчески доступны лишь с 1990 года [8.10].

8.7.1.1. Системы насосов

Для СКФЭ применяются как шприцевые насосы периодического действия, так и непрерывно действующие насосы. В противоположность насосам для ВЭЖХ, контролируемым по потоку, насосы СКФЭ контролируются по давлению. В применении шприцевых насосов есть то преимущество, что они дают крайне низкие пульсации. Это важный критерий в СКФХ с полыми капиллярными колонками. Поэтому шприцевые насосы применяются преимущественно для онлайн-комбинации СКФЭ-СКФХ. Недостатком этих насосов является то, что объем ограничен максимально 250 мл. Если поршень шприца пуст, необходимо остановить экстракцию и снова наполнить насос. Эта ситуация особенно часто встречается, в частности, в оффлайн-СКФЭ, так как здесь работают с большими объемами проб и экстрагентов, а также проводят параллельно несколько экстракций. Квазинепрерывная работа возможна с двумя шприцевыми насосами, но против этого говорит высокая цена. Рис. 8.6 показывает принципиальное устройство оффлайн-экстрактора.

Непрерывно действующие насосы, напротив, имеют то преимущество, что нет ограничения по времени экстракции из-за ограниченности объема насосов, можно работать с большими объемами проб и экстрагировать несколько проб одновременно. Непрерывно действующие насосы, которые применяются для СКФЭ, — это двойные поршневые насосы ВЭЖХ, головки которых охлаждаются жидкой двуокисью углерода или закисью азота. Наряду с двойными поршневыми насоса-

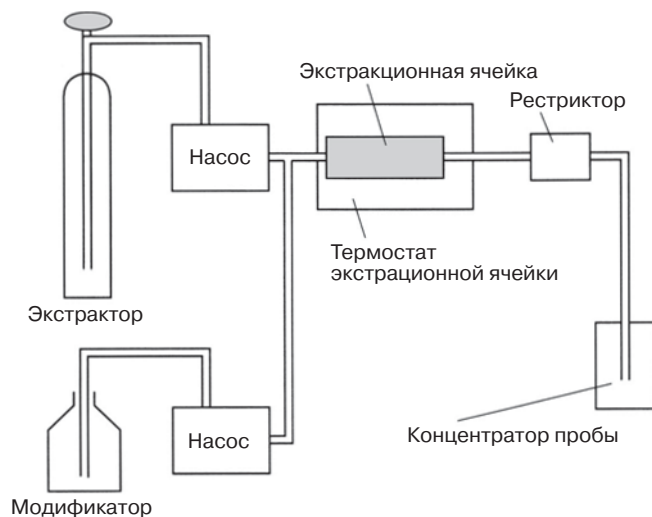


Рис. 8.6. Схема устройства отдельно стоящего прибора для СКФЭ

ми применяются также пневматические насосы с усилителем давления, которые известны как насосы для заполнения ВЭЖХ-колонок. Непрерывно действующие насосы могут также примешивать к двуокиси углерода такие модификаторы, как ацетон или метанол, что позволяет проводить быстрое изменение состава элюента.

8.7.1.2. Экстракционные сосуды и печи

Для экстракции сверхкритическими флюидами пробы нужно поместить в прочные экстракционные сосуды. Эти емкости могут быть, например, пустыми ВЭЖХ-колонок. Их можно наполнить непосредственно твердыми пробами. Фритты с узкими порами (0,5 мкм) на обоих концах экстракционной трубки препятствуют выносу частиц наружу. В зависимости от вида системы (онлайн или оффлайн) используются экстракционные сосуды с объемами от 0,1 до 50 мл.

Для термостатирования экстракционных сосудов можно использовать термостаты газохроматографических колонок, нагреваемые металлические блоки или ванны. Для установления точной температуры должна учитываться тепловая инертность экстракционных сосудов, так как иначе воспроизводимость результатов экстракции может оказаться плохой.

8.7.1.3. Рестрикторы

В рестрикторе давление экстрактора опускается до атмосферного. Такие сверхкритические флюиды, как двуокись углерода и закись азота, переходят здесь в газообразное агрегатное состояние и теряют при этом свои растворяющие способности. Ранее растворенные в экстракторах соединения могут задерживаться за рестриктором и отделяться от газообразного экстрагента.

Проблемы могут возникнуть в том случае, если соединения, которые прежде были растворены в сверхкритическом флюиде, выпадают в рестрикторе в осадок в результате потери растворяющей способности флюида из-за его превращения в газ. Соединения, которые конденсируются в рестрикторе, в большинстве случаев не вызывают проблем, так как под высоким давлением их вынесет потоком из рестриктора. Тем не менее, если компоненты выпадают в виде твердых материалов, то рестриктор может засориться или проявятся эффекты «памяти».

В качестве рестрикторов могут применяться вручную или электрически регулируемые вентили обратного давления с переменным и регулируемым или постоянным потоком. К рестрикторам с постоянным давлением (и, следовательно, с регулируемым потоком) относятся мембраны, кварцевые капилляры с малым внутренним диаметром от 10 до 50 мкм. Все рестрикторы имеют свои преимущества и недостатки. Так, клапаны обратного давления дают возможность легко менять поток. Если клапан засорен твердыми выпавшими в осадок компонентами, они могут быть удалены открытием и закрытием клапана. Так как клапаны обратного давления имеют все же относительно высокий мертвый объем, они легко могут давать эффекты «памяти». Демонтаж и чистка этих клапанов действительно трудоемки.

Рестрикторы с постоянным потоком отличаются маленьким мертвым объемом в несколько микролитров. Опасность засорения такого рестриктора, тем не



менее, выше, чем для рестрикторов с переменным потоком, в частности, из-за проявления эффектов Джоуля–Томпсона для неидеальных газов. Благодаря эффекту Джоуля–Томпсона неидеальные газы, такие как двуокись углерода и закись азота, охлаждаются и усиливают, таким образом, выпадение соединений в виде твердых веществ в рестрикторе. Этот эффект может быть настолько силен, что даже при холостых опытах без пробы рестрикторы засоряются сухим льдом. По этой причине необходимо обогревание рестрикторов. При этом должна быть выбрана температура настолько высокая, чтобы ни один из экстрагируемых компонентов пробы не выпадал в осадок в рестрикторе. Вместе с тем нужно непременно избегать термического разложения при слишком высоких температурах рестриктора.

8.7.1.4. Концентрирование проб

Концентрирование экстрагируемых проб происходит у онлайн-системы в охлаждаемой ловушке с возможно меньшим мертвым объемом. Эта охлаждаемая ловушка находится под атмосферным давлением, и экстрагируемые компоненты накапливаются на стенках ловушки. В качестве ловушки в большинстве случаев служит кусок деактивированной стеклянной трубки с внутренним диаметром меньше 0,5 мм, который подсоединяют непосредственно к ГХ- или СКФХ-колонке. В некоторых случаях пробу концентрируют непосредственно в начале колонки, чтобы уменьшить мертвый объем и минимизировать уширение пиков.

Чтобы предотвратить вымывание летучих компонентов газообразным экстрагентом, ловушку охлаждают до низкой температуры ($\sim 0^\circ\text{C}$). Выбором температуры охлаждения можно сконденсировать или только труднолетучие компоненты (температура охлаждения до -10°C), или также и легколетучие компоненты (температура охлаждения до -65°C).

В автономной СКФЭ экстракты проб концентрируются в растворителе или на твердых фазах. В первом случае выходящий из рестриктора поток газа поглощается подходящим растворителем. Во втором случае экстрагируемые компоненты концентрируются на твердых адсорбентах, таких как активированный уголь, модифицированный или чистый силикагель. Твердые сорбенты могут сильно связывать компонентами и обеспечивать, вследствие этого, в частности, в случае летучих соединений более высокую степень обнаружения. Следующим этапом, после окончания экстракции, является десорбция сконцентрированных компонентов подходящим растворителем. При этом может происходить дополнительное фракционирование за счет десорбции растворителями с разной полярностью.

8.7.2. Автономная СКФЭ

Автономная СКФЭ используется только для пробоподготовки и поэтому не связана с последующим анализом. Экстракты остаются в растворителе и могут анализироваться многими методами, такими как хроматография (ГХ, ВЭЖХ и СКФХ), капиллярный электрофорез, спектроскопия (МС, ЯМР, ИК).

Концентрирование в растворителе вызывает автоматическое разбавление экстрактов. Из этого следует, что затем пробы с высоким содержанием аналита можно

исключительно легко разбавлять. Можно экстрагировать большие объемы проб, что важно, если матрица образца неоднородна. С экстрактом также может проводиться несколько разных анализов. Автономную СКФЭ невыгодно применять для анализа следов и для небольших количеств пробы.

Еще одно преимущество автономной СКФЭ – это возможность экстрагировать несколько проб одновременно. Так как экстрактор отделен от последующих аналитических приборов, в одном и том же автономном экстракторе можно проводить одну серию экстракций за другой. Поэтому с помощью автономной СКФЭ за рабочий день может экстрагироваться большее количество проб, чем в тандемной СКФЭ.

8.7.3. Комбинирование СКФЭ-ГХ

Под комбинированной СКФЭ (online-SFE) понимают непосредственное объединение сверхкритической флюидной экстракции с такими хроматографическими методами, как СКФХ и ГХ. Комбинирование с ВЭЖХ реализовать труднее, так как с экстрактом на хроматографическую колонку поступают потоки газов. Для газообразных экстрагентов в тандемных системах с некоторых пор существует техническое решение в форме анализа парового пространства (англ.: Headspace). Комбинированные системы для жидких экстрагентов очень трудоемки и трудны в сборке, хотя даже комбинация ВЭЖХ-ГХ технически выполнима и нашла применение. Для комбинированной системы особенно подходит экстракция сверхкритическими флюидами. СКФЭ может использоваться в комбинации с ГХ и СКФХ как комбинированная техника подготовки и ввода проб.

По сравнению с жидкостями равновесие при СКФЭ устанавливается значительно быстрее, так как скорости диффузии выше. В дальнейшем экстрагент CO_2 можно удалить, просто понизив давление. По сравнению с экстракцией газами (анализ парового пространства) экстрагируется совсем другой набор компонентов. В определенных границах селективность экстракции можно изменять, варьируя давление, температуру, время экстракции и поток, т.е. экспериментально доступные параметры.

Чистота используемого флюида – это критический параметр. Особое значение она приобретает в тандемных системах с капиллярной ГХ. Здесь необходимо применение CO_2 с «СКФХ» степенью чистоты. В остальном следует опасаться проблемы с примесью углеводородов и галогенированных углеводородов.

Растворимость в сверхкритическом CO_2 можно сравнивать с растворимостью в гексане. Предпосылкой к экстрагируемости компонента является его достаточная растворимость в сверхкритическом флюиде. Растворимость связана со следующими параметрами:

- растворимость уменьшается, если полярность компонента пробы и/или его молекулярный вес возрастает;
- растворимость возрастает с ростом температуры при постоянном давлении;
- растворимость возрастает с ростом плотности при постоянном давлении;
- растворимость возрастает при добавлении полярных модификаторов.

Как оптимальный модификатор можно добавлять метанол до концентраций 20%. Коммерчески доступен CO_2 со степенью чистоты «СКФХ» с уже добавленным в определенной концентрации метанолом. Модификатором может служить также вода, которая может оказывать очень большое влияние на степень экстракции. Вообще, полярность флюидов кажется важнее, чем температура и время экстракции. Экстрагент должен не только обладать способностью растворять компоненты пробы, но и извлекать их из «активных» мест матрицы. Для этого растворитель должен быть полярным. С учетом этого эффекта N_2O из-за своего дипольного момента часто лучше подходит для экстракции, чем CO_2 .

Для комбинирования СКФЭ и СКФХ в большинстве случаев используется один и тот же насос, так что все экстрагированные компоненты также снова растворяются и транспортируются через капиллярную колонку СКФХ. Схема устройства тандема СКФЭ с ГХ или СКФХ показана на рис. 8.7.

Основные различия между гибридной и автономной системами заключаются в количествах пробы и связанном с этим концентрированием пробы в охлаждаемой ловушке. Для гибрида с ГХ экстракты пробы могут быть также сконцентрированы на охлаждаемой ГХ колонке. Так как все проэкстрагированные компоненты подаются на хроматографическую колонку, то тандемная техника имеет

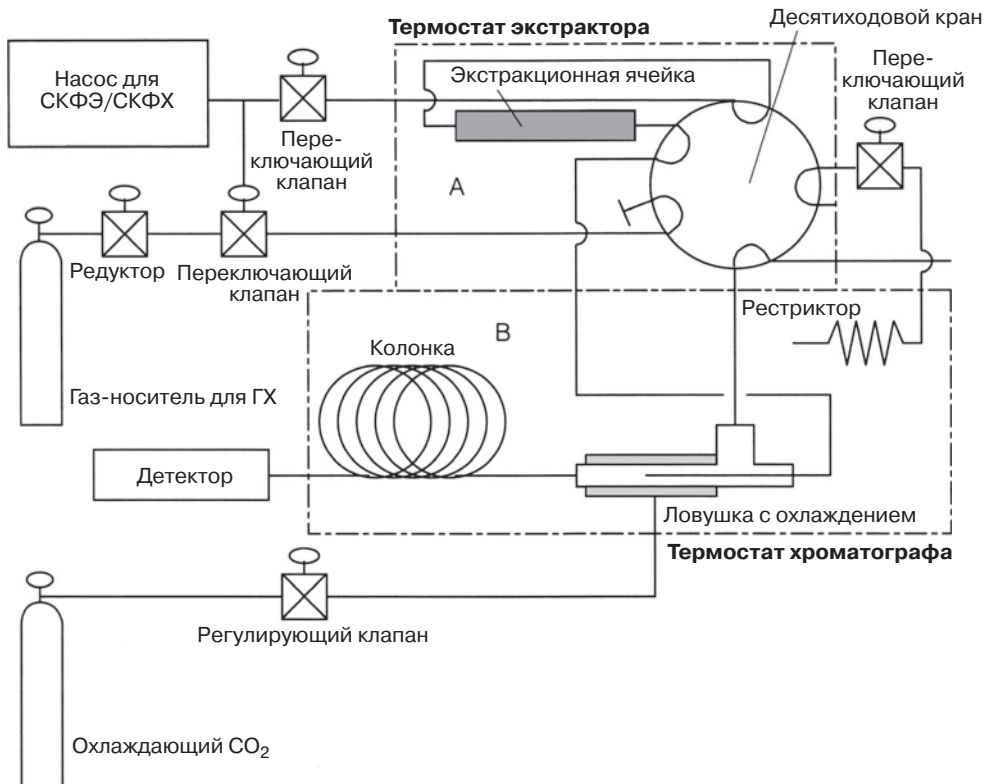


Рис. 8.7. Схема тандемной СКФЭ конструкции с СКФХ или ГХ: А – термостат экстрактора; В – термостат хроматографа

явное преимущество, если в распоряжении имеется лишь небольшое количество пробы и если нужно обнаружить следовые количества вещества.

Кроме того, на хроматограммах СКФЭ-ГХ или СКФЭ-СКФХ отсутствуют пики растворителей, так что нет проблем, связанных с коэлюированием раноелюируемых компонентов с растворителем. Это является проблемой анализа следовых количеств с помощью ГХ или СКФХ, где в результате ввода больших объемов проб появляются широкие пики растворителя.

Для анализов в тандеме СКФЭ-СКФХ проба вводится в сосуды для экстракции, которые помещают в экстракционный термостат. Экстракция, концентрирование проб, хроматография и оценка данных могут быть полностью автоматизированы и проведены на одном аналитическом приборе. Разумеется, во время экстракции хроматограф использоваться не может, и в процессе хроматографического разделения не может проводиться экстракция. Из-за этого пропускная способность тандемных приборов меньше, чем автономных экстракторов.

Недостатки тандемной СКФЭ проявляются, если нужно анализировать большие объемы проб с высоким содержанием аналитов, так как при этом легко перегрузить хроматографические колонки. Загрязнения из сверхкритического экстрагента, а также из экстракционных сосудов, например, отпечатки пальцев, накапливаются и могут испортить хроматограмму. Для переключения между экстракцией и хроматографией в тандемной СКФЭ должны применяться устойчивые к давлению клапаны. Так как они всегда имеют мертвый объем, то их нужно тщательно проверять на эффекты «памяти» отложившихся компонентов проб.

8.7.3.1. Динамическая экстракция

Для динамической экстракции применяется экстрактор, аналогичный представленному на рис. 8.7. Во время экстракции свободный экстрагент непрерывно прокачивается через экстракционные сосуды. Благодаря постоянному растворению компонентов пробы новое равновесное распределение устанавливается постоянно вновь между матрицей пробы и экстрагентом. Степень экстракции можно оптимизировать изменением времени экстракции. Исходя из начальной массы m_0 , масса компонентов пробы убывает со временем как $\ln(m/m_0)$. На практике это значит, что время экстракции должно увеличиваться экспоненциально при стремлении к 100%-ной степени экстракции.

8.7.3.2. Статическая экстракция

Для проведения статической экстракции между экстракционной ячейкой и рестриктором и, возможно, также между насосом и ячейкой установлен вентиль. Перед экстракцией вентиль закрывается, и в ячейке устанавливаются заданные параметры экстракции. Чтобы избежать диффузии компонентов в растворе обратно в насос, рекомендуется устанавливать второй клапан между насосом и ячейкой. Если нужно отказаться от второго клапана, то между насосом и экстракционной ячейкой должны помещаться капиллярные трубки малого внутреннего диаметра и соответствующей длины, чтобы избежать обратной диффузии растворенных компонентов пробы в насос. В противном случае могут появиться эффекты «памяти».



При этом во время экстракции в течение нескольких минут концентрация пробы в экстрагенте достигает насыщения. После установления равновесия клапан между ячейкой и рестриктором открывается, и экстракт отбирается. В другом варианте экстрагент откачивается насосом непрерывно через ячейку, и экстракт забирается через клапан. Такие экстракции с объемом ячейки в несколько литров применяются в химии пищевых продуктов, чтобы, например, декофеинировать кофе или удалять никотин из табака.

Статическая экстракция представляет большой интерес, если растворимость должна устанавливаться в зависимости от температуры экстракции, давления экстракции и добавления модификаторов. Она, однако, редко обеспечивает полную экстракцию. Если растворимость экстрагируемых соединений незначительна, статическая экстракция малоэффективна.

Если нужно исследовать влияние модификаторов, но нет возможности добавлять модификатор к сверхкритическому флюиду или применять предварительно смешанные экстрагенты, интерес представляет комбинация статической и динамической экстракций. В этом случае определенный объем жидкого модификатора, например, ацетона или метанола, вносят в ячейку с пробой и проводят затем статическую экстракцию. После статической экстракции можно дополнительно провести динамическую экстракцию чистым экстрагентом, чтобы еще больше повысить эффективность экстракции. Недостатком снова является низкая растворимость, так как во время динамической экстракции модификатор быстро вымывается из ячейки и, вследствие этого, полная экстракция не достижима.

Эффективной является техника статической экстракции с модификатором и последующей динамической экстракцией чистым экстрагентом, например, для экстракции полихлордифенилов (ПХБ) из осадка в сточных водах. Неполарные ПХБ очень хорошо растворимы в чистом сверхкритическом CO_2 , однако чистой двуокисью углерода только с трудом могут экстрагироваться из осадков. Причина этого – в сильных взаимодействиях ПХБ с полярными центрами осадка. Модификаторы уменьшают эти взаимодействия во время статической экстракции. Тогда в последующей динамической экстракции ранее высвобожденные ПХБ могут экстрагироваться полностью.

8.8. Применения

Возможностей применения СКФЭ очень много [8.11]. Всюду, где классические процессы экстракции долгое время работают с экстрактором Сокслета, можно с успехом применить СКФЭ. В дальнейшем СКФЭ могло бы быть идеальным методом для замены протоколов, которые основываются на отгонке водяного пара. Различие между СКФЭ и жидкостной экстракцией состоит в том, что для последней существует уже множество стандартизованных методов или имеется большой накопленный опыт. Нужно ожидать, что для СКФЭ скоро так же будут отработаны условия экстракции. Как области применения особенно интересными кажутся следующие приложения:

- в области экологии – прежде всего анализ почв, продуктов сгорания, пищевых продуктов и прочих твердых проб;
- СКФЭ – это классический метод, применяемый в промышленности для декофеинизации и производства экстрактов ароматических масел и концентратов ароматных веществ;
- интерес представляет исследование лекарственных растений, из которых выделяются экстракты масел, а также контроль сырья и контроль готовых изделий на основе таких масел;
- в пластмассовой промышленности возможно определение мономерных звеньев или добавок к полимерам.

Комбинация СКФЭ и ГХ или СКФХ делает возможным анализ следовых количеств непосредственно в твердых пробах в области нескольких фемтограмм на грамм пробы. Особенно тандемная СКФЭ подходит для решения биологических или медицинских задач, так как здесь в распоряжении, как правило, имеются только небольшие количества проб.

Автономная СКФЭ, которая не зависит от последующей аналитики, представляет большой интерес для задач экоанализа, анализа пищевых продуктов и полимеров. Особое значение имеет возможность экстрагировать большие количества проб до 50 г. Селективные экстракции могут проводиться выбором подходящих условий экстракции. Вследствие этого получают очень чистые экстракты. Поэтому можно избежать этапов очистки и концентрирования, которые необходимы в классических процессах экстракции.

8.9. Выводы и обзор

Согласно физическим свойствам сверхкритические флюиды находятся между газами и жидкостями. Сверхкритическая флюидная хроматография объединяет, вместе с тем, возможности газовой и жидкостной хроматографии. Широко используемая двуокись углерода в сверхкритическом состоянии будет гораздо лучшим растворителем, чем в нормальном состоянии. Круг задач СКФХ составляют проблемы, которые нельзя удовлетворительно решить ни с помощью ГХ, ни с помощью ВЭЖХ. Таким образом, с помощью флюидной хроматографии возможно разделение при низкой температуре термолабильных, а также химически активных веществ. Также высокомолекулярные вещества и смеси олигомеров, которые без дериватизации не могут анализироваться с помощью ГХ, можно анализировать этим методом. В противоположность ВЭЖХ СКФХ может использовать наряду с ультрафиолетовым детектором множество универсальных детекторов, таких как ПИД, ФТ-ИК и МС.

Число публикаций показывает, что хроматография с флюидными фазами как метод разделения, вероятно, прошла наивысшую точку своего развития уже несколько лет назад. После максимума в 1989 году произошел спад интереса к этому методу и остановка его развития. Это, конечно, связано с чрезмерными ожиданиями, которые были связаны с внедрением капиллярной СКФХ. С одной стороны, этот метод страдает от тех же самых проблем растворимости, как и ВЭЖХ, а с



другой стороны, аналогичным образом можно использовать целенаправленные взаимодействия между подвижной и стационарной фазами, например, добавлением метанола. СКФХ имеет по сравнению с ГХ то преимущество, что пробы не нужно испарять.

В качестве подвижной фазы в большинстве случаев рассматривается только CO_2 , так как в этом случае можно работать с пламенно-ионизационным детектором, что невозможно, например, при использовании пентана. В отличие от ВЭЖХ, СКФХ обладает тем дополнительным преимуществом, что объемы отходов растворителя малы. СКФХ занимает нишу в области анализа термолабильных, высокоактивных низкомолекулярных соединений. СКФХ может в некоторых случаях заменять ВЭЖХ, когда нужен очень быстрый рутинный анализ.

В качестве критики современных систем СКФХ нужно отметить большие технические, а также финансовые затраты. Если речь идет о том, чтобы выбирать самую экономичную хроматографию, то сначала всегда нужно рассматривать ГХ. Если этот выбор невозможен из-за свойств анализируемой пробы, то полезно проверить пригодность СКФХ. Вследствие относительно короткого времени анализов и простой постановки методов она представляет в большинстве случаев более экономичную альтернативу ВЭЖХ. Любой метод анализа зависит от доступности оборудования. Поэтому для СКФХ как недавнего пополнения хроматографического семейства едва ли удивляет тот факт, что предлагаемые на рынке приборы еще не полностью удовлетворяют желаниям практикующих аналитиков. Следует ожидать, что желаемые улучшения реализуются уже в ближайшем будущем для следующего поколения инструментов.

В хроматографии со сверхкритическими флюидами есть тенденция к использованию наполненных колонок. Как из практических, так и из теоретических соображений применение наполненных колонок более выгодно. В распоряжении имеется большое количество стационарных фаз, и в принципе можно использовать все ВЭЖХ колонки. С наполненными колонками достигают более высокой воспроизводимости, так как могут вводиться большие объемы пробы. Поток может регулироваться независимо от давления и поддерживаться постоянным. Скорость анализов существенно выше в случае наполненных колонок, чем капиллярных.

Конечно, нелегко будет убедить пользователей капиллярной СКФХ в преимуществах и возможностях СКФХ с наполненными колонками. Наряду с более простой и воспроизводимой доступностью систем с нормальными фазами, то есть хроматографии на полярных стационарных фазах с неполярным элюентом CO_2 , еще одним преимуществом наполненных колонок является то, что с ними могут быть использованы высокочувствительные детекторы газовых хроматографов, такие как ПИД, ДЭЗ и АФД. При этом ДЭЗ и АФД могут быть использованы также при добавлении органических модификаторов, как, например, метанола.

8.9.1. Экстракция сверхкритическими флюидами (СКФЭ)

В ходе мероприятий по охране окружающей среды и безопасности труда наблюдается тенденция к отказу от методов, которые применяют химические раствори-

тели и ядовитые химикаты. Альтернативой является экстракция веществ из комплексных матриц сверхкритической двуокисью углерода. Инновационным толчком в области сверхкритической флюидной хроматографии в середине 80-х годов стало развитие СКФЭ как независимого метода пробоподготовки. В области приборостроения развитие в течение последних лет проходило быстро. Пример тому — множественный или автоматический анализ проб. Как правило, СКФЭ сравнивается с экстракцией в аппарате Сокслета, которая в течение многих лет считалась стандартным методом в органической аналитике следовых количеств.

Тем не менее, экологические и экономические недостатки экстракцией в аппарате Сокслета не нужно игнорировать. В первую очередь они основываются на высоком потреблении растворителя и относительно больших затратах времени. Невысокие инвестиционные требования являются преимуществом, но относительным из-за низкой производительности.

СКФЭ имеет то преимущество, что неполярные вещества могут легко экстрагироваться из полярной матрицы. Экстракт получается относительно чистый, избирательность экстракции может легко варьироваться изменением давления и температуры (плотности) флюидов. Химическая инертность, благоприятные критические величины и экологическая безопасность позволяют применять для СКФЭ неполярную двуокись углерода различной степени чистоты. Экстракты существуют без растворителя и могут анализироваться без проблем оптимальными хроматографическими методами разделения. Полярность двуокиси углерода может варьироваться добавлением химических модификаторов в широких областях, что может, однако, невыгодно отражаться на избирательности.

Возможность соединять СКФЭ с другими инструментальными методами, как, например, с газовой хроматографией или масс-спектрометрией, открывает широкую область применения. Происходит ли комбинирование методов в автономном или тандемном режиме, зависит при этом от материала пробы, от количества аналита и от нескольких других параметров.

Стадия проб и ошибок уступила в СКФЭ систематическому изучению теоретических основ. Сегодня теоретическое рассмотрение концентрируется все больше на взаимодействии матрица–аналит–флюид. Здесь нужно найти оптимум, а не максимум. Для часто исследованных и, поэтому, известных матриц, как, например, у сертифицированных проб, это удается относительно легко. В обработке реальных проб (земли) часто возникают неожиданные трудности из-за ее гетерогенного состава.

После того как Агентство защиты окружающей среды (EPA, Environmental protection agency, федеральное учреждение США) запретило использование галогенированных углеводородов в производстве и аналитике, интерес к удовлетворяющим экологическим требованиям и экономящим время СКФЭ в США сильно возрос в течение последних двух лет. Как первый официальный процесс EPA признала экстракцию углеводородов из нефтьсодержащих земель. В настоящее время разрабатываются другие процессы, например, экстракция гербицидов, хлорфеноксисукусной кислоты и полиароматических углеводородов (ПАУ).

СКФЭ открывает новые пути в анализе пищевых продуктов. Она позволяет избирательно экстрагировать из жиров углеводороды, которые образуются в кон-

сервах при облучении, и определять, таким образом, качественно ли была проведена предварительная обработка продуктов. Количественное определение жиров в различных продуктах может занимать до 30 мин, в то время как для классического метода нужно больше 10 час. Наряду с сокращением потребностей в растворителе прежде всего сокращение времени анализов говорит в пользу замещения классических методов экстракции СКФЭ.

Следующая возможность использования сверхкритического флюида – это санация экологически вредных отходов, которая исследуется в настоящее время в различных научных проектах. Экстракция в этом случае проводится сверхкритической водой. При этом целью является не количественная экстракция вредных органических веществ, а их химическая деструкция в матрице.

Экономические, токсикологические и связанные с экологией причины определяют повышенный интерес к технике СКФЭ, причем США снова является лидером. Нужно надеяться, что наряду с СКФЭ СКФХ также найдет применение, по крайней мере, с наполненными колонками.

ГЛАВА 9

КАЧЕСТВО АНАЛИЗА

В аналитике все больше стремятся улучшить качество результатов измерений. Нужно доказать, что примененный пользователем аналитический метод также действительно подходит для решения данной проблемы. При этом эффективность прибора и метод анализа, подкрепленные статистической обработкой результатов, создают основу стандарта качества и, вместе с тем, доказательство того, что именно эта система и этот метод могут быть использованы при решении данной проблемы [9.1]. Раньше, когда мир еще не был столь взаимосвязан, вся разработка метода в лаборатории находилась в руках одного сотрудника. В это время химик или аналитик еще могли дать точный заказ на изготовление, согласно которому должны были быть сконструированы измерительные приборы.

В наши дни каждый работает в определенной узкой области. Прежде чем пользователь увидит прибор, множество специалистов в области электроники и специалистов по измерительным и регулирующим приборам совместными усилиями долго разрабатывают измерительные приборы, для того чтобы потребитель получил простой, обладающий большими возможностями и простой в обращении прибор. Приборы служат не благородным идеям науки, а основанной на цене перманентной необходимости экономических действий. В отдельных случаях это может вести к глобальным конфликтам между желанием и возможностями в аналитической работе.

Например, техническое обслуживание прибора стоит дорого и вместе с тем требует много усилий. Из-за сложности измерительных приборов, с одной стороны, и высокой специфичности — с другой, не всегда, к сожалению, существует полное понимание функциональности и устройства измерительного прибора. Какой химик, например, уже во время обучения по специальности может задуматься об устройстве ПИД-усилителя в газовых хроматографах? Эти знания в большинстве случаев были бы бесполезны, но в отдельных случаях это могло бы, однако, оказаться все же очень полезным в случае поломки ПИД-устройства.

Во время обучения в университете прибор наиболее подробно изучают в ходе выполнения дипломной работы или диссертации. У других приборов изучают принцип действия. В дальнейшей профессиональной деятельности специалист готов к работе с целой группой приборов. Желательно еще продолжить дополнительное обучение химика микроэлектронике. Техническое обслуживание нужно предоставить специально обученному персоналу.

Здесь для понимания проблемы может быть применен рабочий подход. Даже когда пользователь и техник говорят на одном языке, аналитику может быть трудно объяснить технику свою проблему с прибором, так сказать, пролить свет на проблему. Слишком распространен профессиональный сленг. Техник думает часто в ожидаемых величинах и напряжениях, аналитик — в феноменах, которые можно наблюдать в эксперименте. Так как пользователь, как правило, самостоя-



тельно только условно может обслуживать приборы, то их для обслуживания нужно отдавать в компетентные руки. Это не всегда должен быть человек со сторонней фирмы. Начиная с определенного размера парка приборов, может быть выгодно нанять штатного техника для рутинного обслуживания.

Приборы должны поддерживаться, безусловно, на должном техническом уровне, так как состояние приборов оказывает непосредственное влияние на качество анализа.

Качество анализа определяется многими факторами, причем «само измерение» является лишь частью этого процесса, а качество приборов, возможно, даже наименее критично. Когда бухгалтер многократно пересчитал свою кассу и получил разные результаты, он, вероятно, допустил ошибку. Если, с другой стороны, аналитик много раз проанализировал одну пробу и все равно получил разные результаты, все в порядке, если различия не слишком велики. Очевидно, есть основное различие между двумя процессами.

Бухгалтер считает пфенниги, что должно привести к однозначному определенному результату; он работает с цифрами. Аналитик тоже охотно сосчитал бы атомы, но они слишком малы и их слишком много. Он работает аналогично – с измеряемыми величинами, которые не могут быть абсолютно точны, и с выборками, которые более или менее репрезентативны для материала, подлежащего исследованию. Пределы для возможных результатов первоначально отсутствуют, но возникают при их округлении, которое автоматически проводится измерительными приборами. Это ведет к парадоксальной ситуации, когда распределение вероятностей результатов тем выше, чем больше точность их определения.

Умеренная флуктуация результатов является характеристикой качества, а не поводом для критики.

Аналитика не является самоцелью, которая «зарывает в землю» полученные данные, но имеет совершенно определенные задачи. По результатам анализа ставят диагноз, который, в свою очередь, может потребовать терапии. Данные должны соответствовать высоким требованиям достоверности и точности, особенно если нужно исследовать какие-то важные тенденции. Нет гарантии, что это не будет иметь чрезвычайно негативных последствий, несоизмеренных со стоимостью анализа.

Целью анализа является получение гипотетически истинной величины. Истинная величина не определена. Можно определить величину, которая наиболее близка к истинной величине.

Возможность сравнивать стала наиважнейшим условием во всех областях аналитики. Правильность аналитического определения стоит далеко за принятым и отчасти предписанным формализмом (формально принятый критерий сильно занижен относительно истинной достоверности анализа). Отклонения от истинной величины обозначают как систематическую ошибку метода анализа. Чтобы достичь этой цели, следует учитывать влияния, которые выходят за рамки чисто

приборных факторов. Следующие факторы оказывают влияние на результаты анализа [9.2]:

- селективность метода,
- применимость метода,
- практичность метода,
- точность метода.

При соблюдении этих пунктов можно избежать трудоемких ненужных аналитических исследований проб и еще до применения инструментального анализа принять решения, которые освободят исследователя для детального выяснения основополагающих взаимосвязей. Не только независимые организации, но и все больше пользователей сами проверяют установки, используя свои собственные системы контроля качества, чтобы гарантировать определенный стандарт качества. Предпосылкой для правильных результатов валидированного метода (валидированный = соответствующий действительному) является то, что использование приборов в рутинной работе отвечает их компетенции. Поэтому к поставщикам аналитического оборудования предъявляют требование разрабатывать практические руководства, с помощью которых могут быть определены компетенция и эффективность работы приборов.

Требование к возможно большей селективности метода может иметь в повседневной лабораторной работе очень дорогостоящие последствия. В хроматографии это, например, означает, что по возможности должно быть исключено совместное элюирование веществ (неразделенные пики). При большом числе возможных мешающих компонентов это требование загоняет затраты на реализацию измерения в заоблачные высоты. Если раньше довольствовались готовой колонкой и относительно неспецифическим детектором, таким как ПИД или ДТП, то в современном анализе следовых количеств может так случиться, что анализ с помощью двух колонок с разной полярностью и применением специфических детекторов еще не обеспечивает достаточной гарантии однозначной идентификации компонентов. Тогда используют еще один метод анализа ГХ-МС. Часто, однако, специфические детекторы более чувствительны, чем МС, и эту проблему так просто не решить.

Селективность описывает, в какой мере (данным методом) определяются только искомые компоненты.

Даже при анализе тяжелых металлов уже становится недостаточно обнаружить спектр элемента с помощью ИСП. Если раньше было достаточно атомно-абсорбционной спектроскопии или цветных реакций для фотометрии, то сегодня ИСП является тем практическим уровнем техники, который позволяет достичь желаемой надежности анализа, правда, за гораздо более высокую цену. В настоящее время оптимальное соотношение максимальной надежности анализа и рыночной цены дает ИСП-МС.

Применимость метода описывает возможность получить удовлетворительные результаты в интересующем рабочем диапазоне для данной матрицы.

Здесь также следует определить, позволяет ли данная матрица при использовании данного метода получать приемлемые результаты. Так часто разрабатывают нормализованные методы для чистых образцов. Но они перестают работать, когда речь идет о реальных пробах. Это справедливо также и для определения пределов обнаружения, которые в большой мере зависят от сложности матрицы, а не от способностей аналитического прибора.

Практическую ценность метода определяют доступность реагентов, стандартов и аналитических приборов, а кроме того, временные затраты, цены и надежность работы.

Практическая ценность метода, однако, ограничена не только доступностью реагентов, но и проблемой практической работы в лаборатории. Здесь следует обсудить вопросы внутрилабораторного загрязнения образцов или приборов для отбора проб. Пробы воды для определения аммиака стабилизируют хлороформом. Использование новых бутылей для отбора проб при каждом эксперименте существует только в мечтах аналитиков и в кошмарах снабженцев. На практике бутылки с большими трудозатратами, но тщательно вымывают. Если бутылки и крышки применяют исключительно для определения аммиака, то проблемы не возникает. Если же этими крышками закрывают бутылки, которые применяются для определения галогенированных углеводородов, то находят большое количество хлороформа. При той высокой чувствительности, которая достигается с помощью ECD, промывка бутылей является бессмысленной.

Точность метода описывает совокупность всех отклонений.

Сюда же относится воспроизводимость результатов как внутри лаборатории, так и между различными лабораториями. Как раз для области анализа следовых количеств следовало бы при этом указать на наблюдаемые в ряде случаев громадные значения для «слепых» проб. Эти факторы и возникающие проблемы нельзя решить и с помощью столь сложных измерительных приборов. Ни один дорогой современной прибор не способен отличить измеряемую величину, полученную для чистого экстракта, которую нужно учитывать и обсуждать, и величину, полученную для сырого экстракта. Эти приборы в любом случае выдают, однако, числовое значение; поэтому все же нельзя не обращать внимания на то, насколько представительны измеренные величины, если их относят к целому методу анализа и типу пробы.

9.1. Достоверность результатов

Как можно добиться правильных результатов? Для людей строгих правил ответ ясен: одного универсального абсолютно правильного метода не существует. Это может быть строго обосновано математико-статистическими методами. Так как все калибровочные данные получены для проб, которые по содержащимся в них примесям не совпадают с анализируемой пробой, то фактически сравнивают данные, которые принадлежат разным генеральным совокупностям. К сожалению,

здесь нет альтернативы, так как нельзя получить безупречные эталонные пробы. Тут следует довольствоваться воображаемым, тем, что сделано «как будто». Общие методы предлагают только кажущееся решение. Над каждой лабораторией необходимо большими буквами написать:

Недостаток математического образования никогда нельзя узнать так быстро, как по чрезмерной точности в числовых расчетах.

К. Ф. Гаусс

Любые измерения не могут быть полностью лишены ошибок. Это известно каждому водителю, который уже однажды должен был оправдываться из-за превышения скорости. То же самое справедливо для обнаружения веществ в очень малых количествах. Чем ближе подходишь к пределу обнаружения, тем больше становится относительное отклонение результатов от истинной величины. Поэтому данные, полученные с помощью единичного измерения, не имеют смысла. Тем не менее, с ними все же работают. Чтобы получить достоверные величины, необходима исключительная добросовестность при проведении анализа в целом, что еще важнее при определениях в области следовых количеств.

К счастью, количественный анализ несмотря на эти принципиальные проблемы возможен, и есть методы, дающие оценку достоверности результатов. При этом следует учитывать закон Поппера:

В науке, возможно, доказуема только неправильность, а правильность не может быть доказана.

К. Р. Поппер

Интересно, что статистики знали этот принцип задолго до Поппера под названием «Опровержение нуль-гипотезы». Еще раньше ее использовали в судопроизводстве. Применение этого принципа легко продемонстрировать: когда анализ проводят двумя разными методами и получают два очевидно разных результата, конечно, один из них точно является неверным, а возможно — оба. Вывод, что результат верен, когда две величины совпадают, неубедителен. Конечно, вероятность достоверности существенно повышается, поскольку было бы невероятным совпадение, при котором два разных метода давали бы одинаковую ошибку. Этот вывод все же строг только тогда, когда оба метода действительно различны по каждому пункту. Общая стратегия, например, пробоподготовки, которая незаметно может привести к ошибке, обесценивает силу доказательства совпадающих результатов.

Для контроля достоверности в рутинной работе обычно не хватает времени. Пробы часто являются нестабильными, и, наконец, редко кажется, что есть две равноценные эталонные методики, которые могли бы взаимно контролировать друг друга. На практике стараются все же не допускать больших отличий в матрице образца и смеси эталонов и учитывают также то, что эталонные методы принимают во внимание многие помехи. Скепсис в критических случаях является все-таки уместным.

Помехи являются отчасти очень коварными и могут быть выявлены только с помощью лабораторных систем диагностики. Чтобы достичь по возможности высокой степени надежности анализа, рекомендуются следующие меры:

- введение карт контроля стандартов: при этом один стандарт рутинно всегда обрабатывается с серией определений. В ходе многократных определений пробы делается вывод о воспроизводимости анализа;
- применение дополнительного метода для выяснения эффектов матрицы;
- применение сертифицированных стандартов.

Сертифицированные стандарты служат для проверки самих калибровочных растворов в данном методе. К сожалению, в продаже есть только немногие сертифицированные пробы, которые включают актуальные химические загрязнители окружающей среды. Например, для анализа тяжелых металлов можно найти широкое предложение разнообразных матриц; также доступны пробы для органического анализа трудно разлагаемых хлорорганических инсектицидов или ПАУ.

9.2. Условия практики

Тривиальный ответ на вопрос, насколько хорош может быть анализ, очевиден из всего вышесказанного: никогда не лучше качества отбора пробы. В общей аналитике существует одно твердое правило, которое гласит: 90% ошибок возникает на стадии отбора проб. Особенно неприятно при этом то, что возникает систематическое отклонение, нежелательное при многократных определениях. Другими словами: наименьший источник ошибок для анализируемой величины лежит сегодня в самом измерении.

Здесь еще раз напомним о важности отбора проб. Самый дорогой прибор не может компенсировать ошибки, возникшие при отборе проб. Только умением трудно объяснить, почему один отбор пробы воды (по протоколу с откачиванием до постоянной проводимости и т. д.) должен стоить около 250 евро, если сам анализ стоит только 30 евро. То есть цены растут прежде всего там, где может быть сделано много ошибок или требуется их коррекция.

Современный анализ следовых количеств требует высококвалифицированный и мотивированный персонал. Мотивация сотрудников также важна, как и качество приборов. При этом мотивация может быть как психологическая, так и материальная. Обе помогают добиться хорошего рабочего климата и как можно более высокого качества анализа. Материальная сторона относится в основном к аспекту надежности работы. На основе прогрессирующего ужесточения директив по технике безопасности на рабочих местах, обращения с опасными материалами и т.д. издержки для учреждений по технике безопасности в лаборатории непрерывно растут [9.3].

Вышеупомянутые пункты все более или менее зависят от аналитика. Когда необходимый прибор доставлен в аналитическую лабораторию и находится в хорошем состоянии, тема технического обслуживания и ухода за прибором закрыта. Значение персонала должно, однако, увеличиться, потому что, как и от поставщиков оборудования, увеличение производительности приборов зависит от квалификации обслуживающего персонала. При этом не учитывается, что эти сложные системы часто подвергаются критике, поскольку были заказаны как при-

боры без компьютерной обработки результатов. Предписания немецкого промышленного стандарта (DIN = Deutsche Industrie-Norm), Агентства защиты окружающей среды (EPA = Environmental Protection Agency) или аккредитованной ассоциации химиков (АОАС), как и «неофициальные» методы анализа, дают лишь первую помощь при выборе подходящего метода определения [9.4].

9.3. Обеспечение качеств аналитических определений

Современная научная лаборатория подчиняется множеству директив и требований. Они определены и даны в предписании Правильной производственной практики (GMP), недавно названных Текущей правильной производственной практикой (сGMP), Правильной автоматизированной лабораторной практики (GALP), Правильной лабораторной практики (GLP) или Стандартами качества ISO 9001. Полная воспроизводимость и возможность перепроверки аналитического определения необходимы как во всех аналитических лабораториях, так и в химической индустрии. Никакие другие мероприятия не привели в прошедшие годы к столь большим изменениям в лабораторной работе, чем введение этих протоколов и других систем контроля качества [9.5].

В аналитических лабораториях химической промышленности в рамках управления качеством в настоящее время внедряются три системы:

- основанная на стандартах DIN ISO от 9000 до 9004 согласно рекомендации Президиума Союза химической промышленности (VCI),
- согласно закону о химических реактивах «Основные положения правильной лабораторной практики», GLP,
- согласно европейским стандартам EN 45001 от 1989 года.

Как GLP, так и EN 45001 являются всемирно известными системами управления качества для сертифицируемых лабораторий. Положения GLP возникли в конце семидесятых в США как реакция на недостаточные токсикологические исследования, определяющие критерий допуска медикаментов, и спустя несколько лет распространились в Европе.

GLP требует превосходную документацию каждого этапа проверки, формальные расходы поэтому велики. Для аналитика это значит значительные расходы на обширную документацию, описывающую действия при каждом отдельном анализе, также как полные результаты анализа, так что GLP перевели также в шутку как «Giant lot of papers», гора бумаги [9.6]. Хотя с помощью GLP анализы становятся более надежными, но дополнительные расходы делают их значительно дороже. Обусловленные GLP траты требуют увеличения автоматизации, также как и эффективных систем обработки данных и документации.

Из-за большого значения в целом распространена также аккредитация по системе EN 45001, которая все равно является формальной системой управления качеством, но дополнительно, в среднем один раз в год, с помощью специально обученных сотрудников аккредитованной службы проводится проверка научной и технической грамотности аналитической лаборатории. Требования при аккре-



дитации связаны с постановкой задач в экзаменуемой лаборатории. Лаборатория, как правило, предоставляет ряд методов контроля в пределах используемой техники анализа. С использованием инструментальных методов разработано много различных методов контроля, которыми определяются различные вещества в различных матрицах. Разумно аккредитовать все методы проверки [9.7].

Со времени введения число аккредитаций по стандарту EN 45001 превзошло количество сертификаций по стандартам GLP. Причина лежит в самом названии «аккредитация» вместо «сертификация». Сертификация гарантирует только наличие формальной системы управления качеством к моменту сертификации, в то время как аккредитация гарантирует профессиональную компетентность сотрудников [9.8]. Они обеспечивают вместе с тем также доверие непрофессионалов к лаборатории. ISO 9000 имеет силу как для фирм-производителей, так и для обслуживающих предприятий [9.9].

Особенно фармацевтическая промышленность подчинена через принятые в последние годы законы, прежде всего в области производства, очень высоким требованиям к качеству анализов и их документация. То, какая система используется в лаборатории, зависит от специфики аналитических задач. Большие лаборатории с широким спектром обязанностей могут быть вынуждены реализовать больше систем управления качеством. Чтобы суметь разумно выполнить все требования, следует установить такую систему, которая структурирована согласно DIN ISO 9001, все требования EN 45001 выполнены и при соответствующих проверках также для дополнительных требований GLP открыты [9.10].

Системы управления качеством на химическом предприятии применяются в основном в следующих областях:

- проверка сырья,
- контроль промежуточных и готовых продуктов,
- характеристика новых соединений,
- разработка новых методов получения,
- решение токсикологических и экологических вопросов,
- защита здоровья и безопасность труда, а также маркетинг конкурирующих продуктов.

На большинстве фирм эти задачи распределены между отделами. Анализ сырья, промежуточных и готовых продуктов происходит непосредственно на месте производства в производственных лабораториях. При этом гарантируется быстрый контроль процесса и продуктов. Управление качеством проводится при этом согласно нормам DIN ISO от 9000 до 9004. Так как учреждения и институты многократно требуют непрерывной сертификации закупаемых продуктов, то ISO сертификат является требованием для всех участников рынка – от промышленности основных материалов до сотрудника отдела обработки или продавца. Только соответствующая сертификация или аккредитация дают конкурентоспособность на международном уровне и необходимую уверенность в воспроизводимости результатов проверки, независимую от человеческого фактора.

Такие задачи как, например, методические разработки, дорогостоящая и сервисная аналитика, анализ окружающей среды и следовых количеств, а также ис-

следование новых веществ для использования согласно закону о химикалиях выполняются преимущественно в центральной аналитической лаборатории. Основой всех штатных, технических и организационных мероприятий для обеспечения оптимального лабораторного стандарта с 1983 года являются всемирно известные правила GLP. Лаборатории, которые что-то значат – все равно, в промышленности ли, высшей школе или других научных направлениях, – договорились соблюдать эти правила и подчиняться регулярным проверкам независимой экспертной комиссии.

GLP занимается процессом организации и условиями, в которых планируется, проводится и контролируется проверка лаборатории, также протоколами и отчетами. Руководитель анализа должен обеспечить исполнение основных правил GLP. Он должен к тому же заботиться о квалифицированном персонале, подходящем помещении, техническом оснащении и материале. Управление не может действовать как руководитель контроля или лаборатории.

Согласно общей стандартной инструкции, которая действительна для всех лабораторных подразделений, есть отдельные методические указания к проведению GLP. При введении GLP закладывается фундамент для дальнейшей успешной проверки высшей инстанцией. Чтобы GLP успешно функционировала, необходимо знание основ GLP всеми сотрудниками. Закон о химикалиях требует соответственно мероприятий по повышению квалификации лабораторного персонала и управляющих. В настоящее время существуют следующие общие стандартные предписания для работы:

- основные положения Правильной лабораторной практики (GLP),
- издание и управление стандартными предписаниями по проведению работ,
- GLP послужной список, архивирование протоколов,
- проверяемые вещества,
- реагенты, референтные вещества,
- аналитические приборы,
- мероприятия по безопасности и охране здоровья,
- последовательность действий во время проверки для извещения и регистрации согласно закону о химикалиях,
- план проверки,
- лабораторные записи, протоколы, спектры,
- заключительный отчет и официальное подтверждение завершения.

УСТАНОВКА И УПРАВЛЕНИЕ СТАНДАРТНЫМИ РАБОЧИМИ ПРЕДПИСАНИЯМИ (SOP)

Одним из краеугольных камней GLP является протокол стандартных рабочих предписаний (англ.: Standard operating procedure, SOP). Он описывает последовательность этапов проверки, которые, как правило, не содержатся в плане проверки или указаниях. Каждый отдельный лабораторный элемент должен иметь для проводимых работ стандартные рабочие предписания. Для этих предписаний могут быть дополнительно использованы руководства, опубликованные сборники методов и статьи, а также руководства по применению. SOP регламентирует фор-

му, нумерацию, сферу действия, способ разрешения/распределения, аннулирование, изменения или дополнения и архивирование. Далее они описывают организационную часть и распределение ответственности.

Экземпляр SOP должен находиться в лаборатории в непосредственной близости от приборов и быть в любое время доступен для персонала. Так как он является важным документом GLP, на него распространяются формальные требования к разработке, свободному доступу, копированию, архивированию и уничтожению. На все отклонения должны быть получены письменные разрешения ответственного за проверку.

ПЕРСОНАЛЬНЫЕ ЛИСТЫ GLP

Все сотрудники, которые участвуют в проверке или контрольных заданиях в связи с проверкой, должны обладать соответствующим образованием, навыками и опытом для выполнения поставленных задач. Следует проводить инструктаж всех технических и научных сотрудников на тему образования и повышения квалификации, а также практических навыков и описания задач. Участие во внутренних и внешних мероприятиях архивируют в виде коротких протоколов или актов как приложений к персональным листам.

АРХИВИРОВАНИЕ ПРОТОКОЛОВ

Для архива предписаний, а также для быстрого поиска всех данных и полной документации всех протоколов, промежуточных и окончательных докладов лаборатория должна создать архив. Доступ к архиву получают специальный уполномоченный, его заместитель, руководство учреждения сертификации и сотрудники отдела управления качеством продукции. Отчеты о проверках, планы проверок, необработанные данные, заключительные отчеты, персональные листы, организационные мероприятия, стандартные рабочие указания, лабораторный журнал и журнал технического обслуживания должны храниться в этих архивах в течение 30 лет. Изъятие материалов из архива должно быть задокументировано в письменном виде с указанием предмета и лица, его осуществившего.

КОНТРОЛЬНЫЕ ОБРАЗЦЫ

Контрольные образцы должны сопровождаться следующими данными:

- отправитель/получатель,
- дата получения,
- количество,
- характеристические данные, такие как химическое название, лабораторный код, номер партии, особые указания относительно хранения, обращения или угрозы, данные о сроке хранения,
- для проверки взятого образца.

Резервный образец тестируемого вещества хранится в специальном архиве. Архивирование и право доступа регулируются особым образом. Пробы, тем не менее, хранятся до тех пор, пока их еще можно проанализировать.

РЕАГЕНТЫ, ВЕЩЕСТВА ДЛЯ СРАВНЕНИЯ

Реагенты следует помечать таким образом, чтобы данные о происхождении, идентичности, концентрации и стабильности, а также информация о поставщике и сроке хранения были бы открыты. Обычно достаточно бывает даты поступления в лабораторию и предполагаемого срока хранения, так как производитель сопровождает реагенты необходимыми данными. При всех проверках должна быть уверенность в том, что качество используемых реагентов не повредит им.

Обработка веществ для сравнения (стандартов) такая же, как и проверяемых веществ. Данные о прибытии, обработке, заборе, хранении, стабильности и т.д. должны быть известны. Калибранты, которые используются для функциональной проверки тестирующих систем (аналитические приборы для получения необработанных данных), можно обрабатывать как реагенты.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИБОРЫ

Дизайн и эффективность аналитических приборов должны соответствовать протоколу поставленной задачи. Приборы следует сертифицировать, чтобы гарантировать их соответствие поставленной цели. Приборы для получения, измерения или обработки данных следует калибровать. Если производитель предоставляет руководство к пользованию аналитическим прибором, где функции приборов описаны в понятной форме, заполняется стандартный формуляр. Во всех иных случаях следует выработать короткие описания в форме стандартного рабочего руководства. Устанавливаются вид и частота функционального контроля. Это протоколируется, равно как техническое обслуживание и ремонты, в журнале технического обслуживания или приборном журнале, отчетах сервисного обслуживания.

МЕРОПРИЯТИЯ ПО ОЗДОРОВЛЕНИЮ И БЕЗОПАСНОСТИ

Руководство лаборатории ответственно за здоровье и безопасность сотрудников. Основой мероприятий по оздоровлению и безопасности являются инструкции по предупреждению несчастных случаев от профсоюза химической промышленности. Эти предписания могут устанавливаться ответственным за технику безопасности. В некоторых рабочих группах вводятся дополнительные правила, например:

- приказ о защите от рентгеновского излучения,
- приказ о защите от ионизирующего излучения,
- УФ биотехнология.

Соответствующие задания руководящих сотрудников урегулированы передачей рабочих обязанностей. Для заботы о лабораторных отходах и утилизации канцерогенных, тератогенных и мутагенных веществах существуют специальные указания для предприятия в целом.

ПЛАН ПРОВЕРКИ

Перед началом каждой проверки должен быть в письменном виде выработан план. Планы проверок хранятся, как и необработанные данные. Все изменения, отклонения или исправления плана проверки, согласованные с руководителем провер-

ки, следует, включая обоснования, подписывать у руководителя, датировать и хранить вместе с планом проверки.

План проверки должен содержать данные о названии проверки, о проверяемых материалах и веществах сравнения, а также о дате подписания плана проверки руководством, о начале и конце проверки, о примененном методе тестирования и о сохраненных записях.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЗАПИСИ, ПРОТОКОЛЫ И СПЕКТРЫ

Сырые данные являются исходными лабораторными записями и документами или их заверенными копиями, которые появляются как результат первоначальных наблюдений или действий в ходе проведения проверки. Планы проверок всегда являются сырыми данными. Все сырые данные документируются шариковой или перьевой ручкой, но не карандашом и подшиваются в лабораторный журнал.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЙ ОТЧЕТ

Заключительный отчет должен содержать примерно следующие данные:

- описание проверки тестируемого и контрольного вещества,
- данные о проверяющей организации,
- о времени начала и окончания проверки,
- о заботе о качестве,
- описание используемых методов и материалов,
- о результатах,
- о хранении всех образцов, проб, сырых данных и заключительного отчета.

ЗАЯВЛЕНИЕ О СОГЛАСИИ

Формулирование «заявления о согласии» вменяется в обязанности руководителя проверки. Его составляют после подписания заключительного отчета и вместе с исходными данными направляют на GLP сертификацию. Руководитель проверки и сотрудники несут, таким образом, ответственность за содержание основных положений «хорошей лабораторной практики».

9.4. Система управления лабораторными данными

Автоматизируются не только приборы, но и обработка данных и документация. Лаборатории могут справляться с большим потоком данных только с помощью систем для обработки данных. Автоматизированная документация, которая лежит в основе, облегчает работу аналитика в GLP сертифицированной лаборатории. На рынке появляется все больше производителей, предлагающих Системы управления лабораторными данными (англ.: Laboratory information and management system, LIMS) все большей сложности и совместимости. При большем количестве анализов контролируются точные высказывания о нагрузке прибора, расчеты цены или контроле аналитического инструмента. Современные LIM системы без труда вписываются в информационную структуру целого предприятия, как, например, интегрируемые планирование продукта и система управления хранения [9.11].

В современной аналитической лаборатории появляется все больше инструментов, оснащенных компьютерами. Во многих случаях они оснащены программами для управления, разработки метода, получения данных и их обработки для отчета. Каждый такой прибор имеет, в зависимости от его применения, свой собственный формат отчета. Чтобы получить расширенный, исчерпывающий лабораторный отчет, эти разные источники данных должны быть сведены вместе. Ход пробы в лаборатории должен протоколироваться. Из этих заметок можно формировать отчет о результатах. Поэтому появляются инструментальные аналитические приборы без LIMS интерфейса.

Тем не менее, для оптимального применения такой системы следует быть не только получателем данных, но и принимать активное участие в программировании. С помощью интенсивного сочетания информационной системы и аналитического инструмента методика измерения, прибор и персонал могут оптимально функционировать. С составления рабочего листа начинается автоматизация анализа [9.12]. Начиная с регистрации пробы, планирования каждого отдельного этапа анализа, измерения до составления заключительного отчета все стадии обработки в лаборатории непрерывно документируются при более быстром доступе к данным.

Компьютерная поддержка LIMS играет сегодня важную роль при автоматизации и оптимизации работы в лаборатории, исследовательских и производственных направлениях промышленности и муниципалитета [9.13]. В 80-е годы на рынке появился целый ряд поставщиков различных систем. При этом объем инвестиций может для той же самой системы в зависимости от поставленной задачи и системной концепции сильно варьироваться (от около 10 тыс. до 1 млн евро). Установка LIMS системы для организации лаборатории и соответствующего офиса может при этом занимать на разных этапах разное время. Ввиду этого ставятся следующие вопросы:

- В каком соотношении и в какой зависимости находятся выгода от LIMS и ее цена?
- Какое технологическое развитие наблюдается в окружении LIMS и поэтому следует принимать во внимание, чтобы ориентировать системное решение на прочную основу для будущего и избегать ошибок?

Отличительная черта эффективности LIMS сильно развилась. Современные LIMS поддерживают аналитиков также при соблюдении инструкций. В этом случае в лаборатории должны быть точно известны не только аналитические методы, но также должно приниматься во внимание правовое регулирование их рекомендации. Многие лаборатории должны сегодня доказывать, что их компьютерная система работает согласно предписаниям. Это означает, что как компьютер, так и используемые программы должны быть сертифицированы, чтобы удовлетворять установленным предписаниям.

Если данные анализа попадают непосредственно в компьютер, их можно обрабатывать в электронном или распечатанном виде как исходные данные. Если сохраняется распечатка, электронная копия данных может быть уничтожена. Наоборот, если данные хранятся в электронном виде, должна быть возможность представить их в читабельной форме спустя 30 лет и более.

9.4.1. Интеграция в рамках проектов с применением системы администрирования хроматографической информации

За прошедшие годы термин LIMS существенно расширился в своем классическом относительно узком значении от ввода пробы до архивирования. Сегодня для систем управления данными характерными стали такие функции, как, например, испытание стабильности, подбор литературы и управление прибором и отчасти действительно обширная система математической обработки. Одновременно сходятся термины LIMS и CAQ (Computer aided quality assurance). Очень многие системы управления данными используются в качестве компьютеризированных систем контроля качества (необработанное вещество/выход продукта, контроль производства/регулирование процесса, выход продукта/конечный контроль) [9.14].

На первый взгляд, сами LIMS домены, исследовательские и конструкторские лаборатории или экологические лаборатории муниципалитета, могут сами участвовать в рассмотрении. Здесь LIMS также используются в качестве CAQ систем. Пищевые продукты, воздух, вода и почвы проверяются согласно спецификациям, которые издает юридическая или медицинская коллегия. Рост участия в экологических информационных системах аналогичен развитию интегрированных CIM систем в промышленности.

Там по праву можно считать, что в исследовании и разработке есть все основания и преимущества для систематического контроля качества. Наоборот, перманентно накапливаемый в процессе контроля качества материал представляет непреложную научную и практическую основу для разработки продукта. В целом LIMS и CAQ системы рассматриваются не более чем изолированные решения, но как компоненты вышеописанной CIM (и, вместе с тем, также DV) стратегии, предъявляя определенные технические требования к таким системам.

В рамках концепции заботы о качестве использование LIMS возможно только с учетом оценки системы [9.15]. К долгосрочным перспективам в области LIMS отмечено, что так называемые научнообоснованные системы всегда находят большее применение. В случае LIM и CAQ систем напрашивается само собой, что знания, полученные с помощью интерпретации и обработки данных измерения и проверки, направляются в систему, постоянно расширяя, таким образом, имеющийся научный базис и с помощью длительно формирующейся экспертной системы содействуют продолжительной оптимизации развития и производства. Важно то, что LIM система так изменчива, что проникает в среду электронной обработки данных (нем.: EDV) предприятия [9.16]. Спрос на информацию распространяется через организацию фирм в целом.

9.4.2. Экономичность систем администрирования лабораторной информации

Информационные потоки на предприятии основываются сегодня еще на исторических фактах и время от времени приспосабливаются к новым требованиям, обусловленным изменением вспомогательных средств и потребностей. Повышенные административные применения управления информацией все чаще требуют

государственные контрольные инстанции. Забота о качестве и снижение цен являются требованиями, которые сегодня на всех предприятиях установлены. В лаборатории проводится экспертиза, соответствует ли продукт, промежуточный продукт или поставленный материал требованиям качества, установленным спецификацией продукта.

Одновременно собирается и накапливается все больше информации, и это часто происходит без понимания потенциальными пользователями. Вследствие этого одинаковые или похожие данные обрабатываются одновременно в нескольких местах, классифицируются и архивируются. Весомым является тот факт, что информация, необходимая для облегчения выполнения задания, предоставлена, но ее очень часто нет в наличии, так как сегодня уже редко можно определить, для какой задачи нужна информация. Избыточный сбор информации является логическим следствием.

Наряду с тремя классическими «китами» экономики — капиталом, рабочим временем и материей — информация является четвертым существенным фактором, обеспечивающим оптимальный экономический процесс. Хорошее управление информацией дает выигрыш прежде всего в тех областях, где обрабатывается много ценных данных. Лабораторная сфера должна поэтому расцениваться с точки зрения информационной экономики, где все же за отдельным результатом часто стоит используемый метод анализа [9.17]. В рекомендациях хорошей автоматизированной лабораторной практики (англ.: GALP) описываются методы интегрирования компьютерных данных. Они, таким образом, дополняют предписания GLP в случае сертификации автоматизированной или управляемой компьютером системы.

Забота о качестве является внутренней контрольной функцией и требует высоких временных и персональных затрат. Этот раздел следит за всеми проверками и контролирует использование лабораторных приборов. LIM системы могут внести ощутимый вклад в ясное и унифицированное управление потоком дополнительных заданий. Цены на компьютеры в последние годы стремительно падают, что повышает значение электронной обработки данных. Одновременно вместо престижа или имиджа критериями выбора становятся эффективный и экономичный подход при использовании компьютерных систем. Основой LIM системы являются базы данных, которые разделены функционально по выполняемым в лаборатории заданиям [9.18].

Если раньше цена компьютера определялась стоимостью «железа», то теперь все больше затрат приходится на программное обеспечение. Многие современные компьютеры, в частности их программное обеспечение, были построены постепенно, без того, чтобы первоначально иметь представление о конечной конструкции. Поэтому компьютерные системы часто устроены очень сложно, и на их дальнейшее развитие необходимы большие средства. Вследствие этого за время, которое требуется на разработку, потребность в данном техническом решении уменьшается.

Однако еще больше растут затраты на обслуживание и поддержку программного обеспечения. Небольшие изменения могут иметь много непредвиденных и нежелательных последствий. Это часто ведет к дополнительной задержке развития. Вместе с тем, ожидаемые затраты на компьютерную систему могут оцени-



ваться по возможности точно, если тенденция доставки идет в направлении стандартизированной системы. Стандартные пакеты программного обеспечения выгодны по цене, предлагают дополнительно гарантию быстрой установки на рабочем месте, техническое обслуживание программы, а ожидаемые функции можно тестировать уже в выбранном методе [9.19].

На практике все еще оказывалось, что в первый год после введения LIMS уровень персонала не претерпевал изменений, тем не менее, собственные задания в области анализа могли бы проводиться более точно и с меньшими проблемами. Сотрудники были освобождены от «администрирования» с помощью «системной помощи». Более того, было принято множество новых задач, о которых без LIMS и думать было нечего. К ним принадлежат документация, подготовка данных к презентации результатов и т.д.

В целом было показано, что только использование широкомасштабной стратегии решений может вести к успеху. Соседство «островных решений», например, маленькой системы управления пробой на основе персонального компьютера, не ведет в этой области к желаемой рационализации. Использование компьютера выглядит как дополнительная помощь, которая, например, дает возможность руководителю отдела получать и управлять интересующими данными, например, для персонального планирования, составления презентаций, табличных расчетов.

9.5. Проблема экологического анализа

Анализ окружающей среды является жизненно необходимым для защиты людей и природы, но он также играет важную экономическую роль, так как представляет быстро растущую и — особенно в Германии — очень выигрышную новую промышленность: экологическую технологию и способ удаления отходов. Защиту окружающей среды следует рассматривать не как бесполезный довесок, но как существенный компонент заботы о качестве продукта, который должен оставаться конкурентоспособным при производстве в стране с высокой зарплатой. Не только популярность у потребителя и цены определяют качество продукта, но и экологическая безопасность станет фактором конкуренции на международной арене. При этом в Германии существует старший специалист-технолог для экологической политики, экологического исследования, экологически безопасного продукта и метода удаления отходов. Соответствующую роль играет Япония в странах Азии.

Обсуждается не только соблюдение законных предписаний в будущем, но и равноправие экологии и экономии. Рынок аналитических услуг в области защиты окружающей среды в последние годы претерпевает большие изменения. С одной стороны, становятся более строгими правовые обязательства — на сцене появляются новые термины, такие как сертификация, аккредитация и экоаудит, — а с другой стороны, неуклонно растет информационная потребность предприятий.

В обоих случаях необходимы достаточно точные и особенно правильные аналитические величины, тогда результаты проверки лаборатории являются основой для хорошо взвешенного решения. При этом нужно обсуждать не только методы и технологии, но также оценку и одобрение со стороны политики, обще-

ственности и промышленности. Прежде всего, наибольший приоритет имеет забота о здоровье и охране окружающей среды. Становится все более ясно, что надежная корреляция с токсикологией необязательна, причем в любом случае получаемые данные анализа должны быть в первую очередь количественно и качественно достоверными.

Аналитическая химия не является экологической химией, но экологическую химию вряд ли можно представить без аналитической химии.

Из-за растущих законных требований к защите окружающей среды анализ воды, почв и воздуха постоянно совершенствуется. Это справедливо как для общего содержания, так и для множества отдельных определяемых компонентов, причем по существу область анализа полна преимуществ. Экологический анализ так бурно развивается, что можно дать только текущее восприятие центральных событий.

В воде и почве содержится подавляющее большинство неорганических компонентов, таких как анионы (нитрат и фосфат) и тяжелые металлы, для анализа которых используют атомно-спектрометрические методы [9.20]. Затем нужно определять хлоруглеводородные соединения, ароматические углеводороды, растворители (бензол, толуол) и средства защиты растений. Анализ органических веществ, как правило, проводят с помощью хроматографии [9.21]. При исследованиях воздуха на первом плане стоит анализ таких вредных веществ, как оксид серы, оксид азота, монооксид углерода и озона [9.22].

Распоряжение о питьевой воде содержит правило о наибольшем количестве каждого химического компонента, в котором установлены предельно допустимые концентрации. Эти величины устанавливают определяемые концентрации отдельных веществ, а для некоторых субстанций также сумму классов. Анализ должен достоверно распознавать и определять вещества в таких концентрациях. С этой целью применяются различные хроматографические и спектрометрические методы, которые определены для каждого класса веществ.

Измеряемая величина вряд ли нужна здесь еще без интерпретации, так как ее содержательность слишком мала. Окружающий нас мир является системой взаимосвязей, где каждое отдельное вмешательство оказывает действие на систему в целом. Экологический анализ начинается с правильного обнаружения искусственно созданной проблемы, например, опасности взрыва в хранилищах отходов, выбросов вредных веществ в биосферу, образования новых вредных веществ при удалении отходов и т.д. Это значит, что нужно выяснять исходную причину и бороться с ней. К тому же необходимо знать производство и ход отдельных процессов. Тогда нужна междисциплинарная совместная работа. Только так целенаправленный анализ с оправданными аналитическими затратами обещает успех, только так можно достичь «прозрачных сточных труб».

Анализ окружающей среды предполагает, что после правильного выяснения проблемы, существующей в действительности, комбинированно применяются

- правильный вид отбора проб,
- правильный метод анализа,
- правильный метод оценки.



Полный ответственный экологический анализ не ограничивается получением данных, аналитик обязан также на основе конкретных детальных знаний в каждом конкретном случае воздействовать на преобразование данных в решения и действия, мероприятия и регламентацию. В экологическом анализе ищут, с одной стороны, простые и легкие в применении, а с другой – быстрые методы. Для этого нужно развивать научные критерии воспроизводимого аналитического метода, чтобы сравнивать его с другими стандартизированными методами.

Защита окружающей среды на предприятии сегодня больше не относится только к отдельным техническим средствам или оборудованию. Соблюдение граничных значений с помощью так называемой End-of-pipe технологии, природоохранной технологии в конце производственного (технологического) цикла, также больше не рассматривается в качестве наилучшего решения. Основное внимание нужно уделять уменьшению отходов, затем переработке и, наконец, их ликвидации, и именно в таком порядке. Ориентированное на будущее развитие нашей страны можно форсировать только общественным признанием совокупных связей и отдельных путей решения, а также признанием технического прогресса.

Существенной предпосылкой экологической переносимости продуктов является, конечно, возможность их утилизации. В биологическом цикле не следует накапливать вещества или их метаболиты, которые отрицательно влияют на окружающий мир или здоровье. Экологическая переносимость продуктов и производства станет критерием конкурентоспособности на международной арене [9.23].

9.5.1. Экоаудит

Охрана окружающей среды рассматривается сегодня с комплексной точки зрения. Предприятия должны доказывать, что они соблюдают соответствующие законные обязательства, владеют системой экологического администрирования и информируют широкую общественность. С момента утверждения распоряжения ЕС 1836/93 «О добровольном участии промышленных предприятий в общей системе управления охраной окружающей среды и опытной эксплуатации окружающей среды» от 13 июля 1993 года и начала его действия во всех странах-участниках ЕС с 1 апреля 1995 года экоаудит играет важную роль на предприятиях. Сертификация в рамках экоаудита дает детальное разъяснение, каких экологических целей хотело достичь предприятие и в какой срок.

Благодаря новому постановлению ЕС об экоаудите появляются новые специалисты в области экологического администрирования. К ним принадлежат консультанты по внутреннему и внешнему аудиту. Консультанты поддерживают предприятие при анализе фактического состояния, при планировании и введении системы экологического администрирования (СЭА). Наряду с ответственностью за СЭА в область их компетенции входит, прежде всего, соблюдение законных предписаний, например, уполномоченного по отходам, защите водных ресурсов или защите от выбросов.

Внешние аудиторы тестируют по поручению клиентов функциональную способность их СЭА. Совершенно новой является профессия экологического эксперта, чья деятельность и квалификация определяются постановлением экоау-

дита. Экологические эксперты должны иметь естественнонаучное, юридическое или производственно-экономическое образование. Им нужны технические знания и знание курса экономики на предприятии (BWL), а также знание экологического законодательства. После работы в среднем в течение трех лет в области защиты окружающей среды они должны сдать экзамен по специальности «экологический эксперт» в Центре аккредитации в Бонне.

9.5.2. Методы Агентства защиты окружающей среды

Целью протоколов аналитических методов является получение сравнимых данных при проведении одинаковых измерений. Хорошая сходимость достижима лишь с помощью анализирующего устройства профессионального качества. Так, важным заданием развитых в США в 70-х годах методов Агентства защиты окружающей среды (англ.: EPA) является забота о квалифицированной работе соответствующих лабораторий. Условия контроля качества и заботы о качестве должны неукоснительно соблюдаться. EPA методы должны строго соблюдаться. Результаты должны быть сопоставимы, отчеты по ним должны оформляться в единой форме. Аналитические методы становятся все более отлаженными и обширными и должны снова и снова приводиться на новейший уровень научной осведомленности и приборного развития. Используемые сегодня 163 EPA метода в области органического анализа окружающей среды установились в течение 20 лет. Большинство методов 70-х – 80-х годов больше не используется. Но уже с начала 90-х годов методы во многом опережают развитие техники и аналитической методологии.

90 из 163 методов по состоянию на март 1994 года занимаются анализом водных проб, 85 – органическими галогенсодержащими соединениями, 44 – пробами почв, 40 – пестицидами, 18 – соединениями серы, 16 – бензолом, 13 – фенолами и 13 – пробами воздуха. В 69 из 163 методов предписан хроматографический анализ с применением стальных и стеклянных колонок, но все же в 89 методах в качестве детектора используется масс-спектрометр, и большинство методов используют газовую хроматографию.

Сегодня строго предписанные EPA методы служат, прежде всего, для контроля и качественной оценки лаборатории. Так как они оказались полезны, множество лабораторий экологического анализа интенсивно финансируется. Квалифицированный экологический анализ требует очень больших временных, материальных, персональных и финансовых затрат. Во многих случаях необходима огромная плотность измерений и/или количество проб для получения данных, с помощью которых возможны действительно надежные и приемлемые заключительные решения проблем. Это, тем не менее, является также финансовой проблемой, и, таким образом, для заинтересованных лиц существует опасность серьезных ошибочных решений.

9.5.3. Правильный экологический анализ

При решении экологически значимых вопросов задействуются все области неорганического и органического анализа. Чтобы иметь возможность оценить потен-



циальные риски, нужно в качестве основы иметь представление о циркуляции элементов или исследуемых соединений в природе и объяснять возможный антагонизм или синергизм. В экологическом анализе речь ни в коем случае не может идти об относительности, но исключительно о правильности. Только такие величины коррелируют с токсичностью или биохимическим событием. Соответственно правильные величины должны быть сравнимыми. При этом специальный анализ приобретает все большее значение, так как релевантным является действие связанных форм элементов или их соединений [9.24].

По степени сложности, охвата, влияния помех и расходов на контроль анализ окружающей среды является «экстремальным анализом». Пробы окружающей среды имеют, как правило, неизвестный сложный состав. Измеряемые величины часто нужно достоверно определить на уровне концентраций, например, $1 \text{ ppt} = 0,0000000001\%$, на фоне миллионов других веществ, существующих в сравнительно низких концентрациях. Это является основным источником ошибочной идентификации, так как до сих пор в таких условиях предъявляются чрезмерные требования ко всем, даже высокоэффективным, спектроскопическим методам.

При ошибочной идентификации вещества, как известно, все является неправильным, включая количественную оценку.

Оценка, которую требует законодатель для фармацевтического процесса производства в течение долгого времени, имеет большое влияние на аналитические лаборатории [9.25]. Под оценкой понимаются доказательство и документация достоверности метода. С введением аккредитации по EN 45 000 оценка метода приобрела большое значение для аналитической заботы о качестве [9.26]. Правильность можно проверять более чем одним методом. Сравнительные испытания не вносят вклад в проверку правильности. Достижимую степень правильности следует рассматривать наряду с воспроизводимостью как фундаментальную характеристику неперменного контроля качества в экологическом анализе.

В экологическом анализе с предписанной методикой и некомпетентными «генераторами данных» из-за очень сложного многообразия веществ систематические ошибки анализа являются скорее правилом, нежели исключением. Специалисты по результатам обзора аналитических лабораторий оценивают долю неверных результатов величиной 90%. Поэтому в качестве аргумента следует серьезно принять тот факт, что систематические ошибки гарантируют систематически неверную обработку, выводы, решения и действия. Ввиду этого многие ученые разработали метод оценки прибора, хотя производители, как правило, дают такую оценку перед поставкой и прилагают к тому же соответствующее руководство. Производители приборов обязуются помогать пользователю с соблюдением правил GLP.

9.5.4. Юридическая строгость решения

Успехи аналитики, определение все более низких концентраций в любой матрице сами по себе не имеют еще никакого смысла. Чтобы помочь аналитике стать «совершеннолетней», важно перейти от сбора данных к интерпретации и обработке

результатов. Результаты экологического анализа нередко являются политической брзантностью. На этом основании достоверная интерпретация результатов анализа в научном смысле является решающе важной. Токсикология не дает, все же, ясного ответа, какая концентрация вещества является опасной и безвредной. Поэтому точность аналитических результатов не является для токсикологии такой решающей, как для юридической стороны дела. Таким образом, на основе этих результатов появляются судебные решения, например, о нарушении концентрационных границ.

Эти решения зачастую должны быть строгими, в качестве заключения требуется ответ «да» или «нет». Но из-за неизбежной нестрогости анализа ни измеряемая аналитическая величина, ни оценка необходимой граничной величины не может быть строгой. Это могло бы быть только результатом анализа, идущим из токсикологии или из средних значений многих величин, измеренных в компетентных лабораториях. Из-за компромиссов или частных решений твердо установленная строгая юридическая граница также реально не существует. Если от аналитики и токсикологии ожидают информативных данных о риске, оценка, напротив, является прерогативой государства.

Политическое решение в большинстве случаев является компромиссным, но компромисс также должен вносить нестрогость, это закон природы! Это справедливо и в критическом случае, как, например, при определении граничного содержания диоксинов, когда локальные границы из политических соображений сдвигаются вверх, подгоняются под повышенные локальные измеряемые величины. Трудно даются судебные решения, а также необходимые исключительно в соответствии с договором определения граничных значений. Экологический анализ становится проблематичным, когда собранные данные вызывают у общественности впечатление тотальной загрязненности окружающего мира. В этом случае необходимо лучше описывать процесс поиска граничных величин.

После установления граничных величин и связи с последствиями их нарушения по умолчанию предполагается, что контроль за соблюдением граничных величин возможен и также установлен. Однако контроль является аналитической проблемой. Поэтому задаются границы действия концепции анализа [9.27].

Современные аналитические методы порой так сложны, что их уже нельзя объяснить общественности. В профессиональных дискуссиях растет скепсис, люди, далекие от науки, больше не верят в подлинность выявленных границ и граничных условий. Таким образом, необходимо популяризировать научные знания и методы, а также результаты исследований среди населения, политиков и критиков. Непонимание ведет к длительной критике и эмоциям.

9.5.5. Проблема отбора проб

Исключительно важная область пробоподготовки не должна быть слишком сложной, но должна быть быстро ликвидируема и реализуема с низкой опасностью загрязнения [9.28]. Автоматическая ликвидация должна быть простой и быстрой. Использование высокочистых веществ позволяет поддерживать необходимый низкий уровень загрязнения [9.29]. Процедура от момента отбора проб вплоть до



проведения измерений должна быть несложной. Наименее контролируемым этапом анализа является, как правило, транспортировка материала с места непосредственного отбора проб в лабораторию. Решающим здесь является отсутствие каких-либо изменений пробы между отбором и анализом или сведение их до минимума. Как правило, для консервирования используют охлаждение или добавление кислот.

Результаты и анализ сами по себе должны быть воспроизводимы в любое время с помощью хорошей и ясной документации [9.30]. Только на примере анализа почв в результате нарушения производственного процесса, при котором нужно количественно определять мелкодисперсный, тонкий и негомогенный по природе своей осадок ядовитого вещества, можно понять, как труден экологический анализ, начиная с отбора проб до обработки, включая метод измерения. Вещества, подвижные в почвах, как правило, легколетучие или хорошо растворимые в воде, относительно быстро распространяются и гомогенно распределяются в почвах. Вещества с небольшой подвижностью в почвах появляются часто как источники с повышенной концентрацией и высоким градиентом в углублении, то есть почва загрязняется очень неоднородно.

В частности, из-за этой неоднородности и необходимости охватывать нагрузку почвы в трех измерениях — в ширину и глубину — делают быстро тысячи проб, которые нужно анализировать и оценивать. Оправдан отбор проб вручную. Если берут слой осадка толщиной от 1 мкм на поверхности почвы на глубине 10 мм в пробе почвы, то приходится разбавлять захваченное вещество уже в 10 000 раз. Если перед забором пробы шел дождь и вредное вещество обладает известной подвижностью, соотношения значительно изменяются. Там, где возможно, правильно и точно замеряют массы проб и площади их поверхностей, поднимая вопрос о том, как получается конечная величина и что нужно из этого, в конце концов, извлечь.

Только множество необходимых анализов требует быстрых и, вместе с тем, высокоточных методов анализа. Для этого предлагаются инструментальная высокопрецизионная планарная хроматография, которая, однако, в EPA методах для анализа почв не встречается и поэтому не допускается. Это справедливо, конечно, в равной степени для всех других неизвестных методов: неизвестные методы вряд ли могли бы быть допущены при сегодняшнем состоянии неприемлемой для будущего аналитики, включая инструментальную аналитическую технику, политику предписаний методов анализа.

9.5.6. Заключительные выводы

Строгие, не подлежащие изменениям методические предписания не подходят для материального экологического анализа. Иначе, чем при многих других стандартизированных методах, в экологическом анализе речь должна идти лишь о правильности величин. Сбор методических предписаний представляет полезный и подходящий для ограниченного периода времени источник информации. Новые аналитические методы измерения требуют зачастую многих лет, пока их признают надежными и утвердят.

Правильные величины, безусловно, сравнимы, но сравнимые величины не всегда правильны.

Стандартизация, сравнимость и сокращение мировых торговых препятствий в целом выступают как основа регламентации в аналитической лаборатории. Текущая ситуация ознаменована множеством специфических положений, которые были введены и официально приняты для различных областей и могут поэтому добровольно приниматься лабораториями, целью которых является сравнимость результатов и забота о качестве процесса.

Квалифицированные экологические аналитики должны иметь свободу выбора метода и комбинации методов, чтобы нести ответственность за полученные данные. Они должны иметь свободу, официально применять еще не допущенные методы и должны принимать распределенную ответственность за оценку и обмен результатов. Экологический анализ является экстремальным видом аналитики и требует большого опыта и знаний.

Область экологического развития ориентирована на будущее. Здесь, с одной стороны, можно увидеть знаки для будущего преодоления экологических проблем, с другой стороны, предлагается возможность с помощью развития новых техник инициировать изменение методов производства и новых материалов для экологически приемлемого решения, которое нам как обеспечивает новые рынки, так и предлагает решения проблем. Образ будущего не требует исчерпывающего ответа на вопрос, что мы не должны больше делать, но должен способствовать инновационным развитиям с целью прорыва, который непременно обезопасит и улучшит условия нашей жизни.

Фирма	GG	UV/Vis	IR	HPLC	CE	LIMS	NIR	RAMAN	IC	Fluoreszenz	MW	AAS	ICP-OES	ICP-MS	MS	NMR	DC	SFC	RFA	Oberflächenanalytik	GD-OES	GC-TOFMS
Chrompack GmbH Postfach 580164, 60406 Frankfurt Tel.: 069-500019-0 Fax: 069-50001950	•			•																		
Desaga GmbH In den Ziegelwiesen 2-7 69168 Wiesloch Tel.: 06222-92880 Fax: 06222-928892																	•					
Deutsche Metrohm GmbH & Co. In den Birken 3 70794 Filderstadt Tel.: 0711-77088-0 Fax: 0711-77088-55									•													
Dilor GmbH Wiesenstr. 4, 64625 Bensheim Tel.: 06251-4042 Fax: 06251-64871 e-mail: 100271.330@compuserve .com								•														
DIONEX GmbH Am Würzgarten 10, 65510 Idstein Tel.: 06126-991-0 Fax: 06126-991-277				•	•				•									•				
Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH Werk Maintal, Postfach 1330, 63463 Maintal Tel.: 06181-4203-0 Fax: 06181-4203-24/26				•					•													
Finnigan MAT GmbH Barkhausenstr. 2 2917 Bremen Tel.: 0421-54930 Fax: 0421-5493396	•												•	•								
Helmut Fischer GmbH + Co Industriestr. 21, 71069 Sindelfingen Tel.: 07031-3030 Fax: 07031-30379										•									•			
Gerstel GmbH Aktienstr. 232, 45473 Mülheim an der Ruhr Tel.: 0208-76503-0 Fax: 0208-7650333	•	•		•											•							
Gynkotek GmbH Dornierstr. 4 82110 Germering Tel.: 089-89468-0 Fax: 089-89468-200				•																		
Hewlett-Packard GmbH Analytische Meßtechnik Hewlett-Packard-Str. 76337 Waldbronn Tel.: 07243-602-0 Fax: 07243-602-212	•	•		•	•	•	•			•			•	•								
Hiden Analytical Niedmannweg 13 82431 Kochel/Ried Tel.: 08857-693010 Fax: 08857-9771															•					•		

Фирма	GG	UV/Vis	IR	HPLC	CE	LIMS	NIR	RAMAN	IC	Fluoreszenz	MW	AAS	ICP-OES	ICP-MS	MS	NMR	DC	SFC	RFA	Oberflächenanalytik	GD-OES	GC-TOFMS
NORAN Instruments GmbH Lusshardtstr. 6, 76646 Bruchsal Tel.: 07251-9791-0 Fax: 07251-9791-11																						
Oxford Instruments GmbH Analytical Systems Division Kreuzberger Ring 38 65205 Wiesbaden Tel.: 0611-764177 Fax: 0611-764121																•			•			
Polytec GmbH Polytec-Platz 5-7, 76337 Waldbronn Tel.: 07243-604-04 Fax: 07243-699-44		•	•				•	•		•										•		
Radiometer GmbH Geschäftsbereich Analytik Linsellesstr. 142, 47877 Willich Tel.: 02154-818-0 Fax: 02154-818-143			•																			
Röntgenanalytik Meßtechnik GmbH Georg-Ohm-Str. 6 65232 Taunusstein-Neuhof Tel.: 06128-71080 Fax: 06128-73601																			•	•		
Shimadzu Europa GmbH Albert-Hahn-Str. 6-10 47269 Duisburg Tel.: 0203-7687-0 Fax: 0203-766625	•	•	•	•			•		•	•		•										
Sopra GmbH Schubertstr. 9-11 64572 Büttelborn Tel.: 06152-98030 Fax: 06152-980322		•			•		•	•		•												
SPECTRO A.I. GmbH Boschstr. 10, 47533 Kleve Tel.: 02821-892-0 Fax: 02821-23144 e-mail: spectro@topbusiness.com						•							•	•					•			
SunChrom GmbH Max-Planck-Str. 22 61381 Friedrichsdorf Tel.: 06172-953350 Fax: 06172-953399				•																		
Thermo Separation Products GmbH Boschring 12, 63329 Egelsbach Tel.: 06103-408-0 Fax: 06103-408-222				•	•																	
TopoMetrix GmbH Pallaswiesenstr. 180 64293 Darmstadt Tel.: 06151-81090 Fax: 06151-810915																				•		
Varian GmbH Alsfelder Str. 6, 64289 Darmstadt Tel.: 06151-7030 Fax: 06151-703237 e-mail: http://www.varian.com	•	•		•		•	•		•	•		•	•	•		•				•		

Литература

- 1.1. Bamelis, P.: F + E bei Bayer – Aufgabe, Organisation, Steuerung. *Nachr. Chem. Tech. Lab. 43*, Nr. 9, 978 (1995).
- 1.2. Günther, W.: Praktische Instrumentelle Analytik, Möglichkeiten – Grenzen – Forderungen. *LABO* Dezember 1987, 7–11.
- 1.3. Hollemann, A.F. und E. Wiberg: Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Berlin, New York: Walter de Gruyter Verlag, 1985.
- 1.4. Hein, H.: Labormanagement in der Umweltanalytik. *Labor 2000*, Ausgabe 1992, 46–52.
- 1.5. Schwarzbach, E.: Grenzen des Nachweises und Qualifikation in der Umweltüberwachung. *LABO* Mai 1988, 11–16.
- 1.6. N. N. (Mitarbeiter der Dechema): Analysengerätschaften – Eine Branche ist auf Wachstum programmiert. *LABO* 12/91, 20–25.
- 1.7. N.N.: GDCh-Fachgruppen und Arbeitskreise. *Nachr. Chem. Tech. Lab. 43*, Nr. 7/8, 859–865, (1995).
- 1.8. Lorenz, W., und M. Bahadir: Analytik zur Steuerung von Abfallströmen. *Labor 2000*, Ausgabe 1992, 36–44.
- 1.9. Hulpke, H. und M. Marsmann: Ökobilanzen und Ökovergleiche. *Nachr. Chem. Tech. Lab. 43*, Nr. 1, 11–27 (1994).
- 1.10. Hein, H.: Umweltschutz auf der Basis von Gesetzgebung und instrumenteller Analytik. *Labor 2000*, 16–26 (1988).
- 2.1. Ettore, L. S., *Analyt. Chem. 43*, 14 (1971).
- 2.2. Ettore, L. S. und A. Zlatkis: *75 Years of Chromatography*. New York: Elsevier, 1979.
- 2.3. James, A. T. und A. J. P. Martin: *Biochem. J. 35*, 1358 (1941).
- 2.4. Van Deemter, J.J., G. Zuiderweg und A. Klíngenberg: *Chem. Eng. Sei. 5*, 271 (1956).
- 2.5. Schwedt, G.: Gas-Verteilungs-Chromatographie von James und Martin 1952. *Labor-Praxis 11*, Nr. 11, 1260 (1987).
- 2.6. Schwedt, G., *LaborPraxis* Juli/August 1988, 821.
- 2.7. Consden, R., A. H. Gordon und A. J. P. Martin: *Biochem. J. 38*, 224 (1944).
- 2.8. Degen, J., R. Look und R. Wernicke: Mathematische Beschreibung von Peaks. *Labor-Praxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 38–43 (1986).
- 2.9. Meyer, V.R.: Richtigkeit bei der Peakflächenbestimmung. *GIT Fachz. Lab. 38*, Nr. 1, 4–5 (1994).
- 2.10. Kuss, H.-J.: Integratoren. Was ist beim Kauf und Anwendung zu beachten? *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 24–28 (1991).
- 2.11. Ræzke, H., H. Ilchmann und J. Behnert: Automatisierung in der HPLC. *LaborPraxis 13*, Nr. 10, 864–866 (1989).
- 2.12. Rieger, A.: Eine Betriebssystemoberfläche für Chromatographiedatensysteme. *GIT Fachz. Lab. 39*, Nr. 5, 450–452 (1995).
- 2.13. Strauss, R.: CIMS – Alternative oder Konsequenz. *LaborPraxis 17*, Nr. 12, 46–48 (1993).
- 3.1. Günther, W.: 25 Jahre Gaschromatographie. Vom Trennen zum Rechnen – Betrachtungen aus lokaler Sicht. *LABO* 26, Nr. 1, 26–34 (1995).
- 3.2. Kaiser, M. A.: Current Status of High Resolution Column Technology for Gas Chromatography. *J. of Chromatographie Science*, September 1986, 24, 369–373.
- 3.3. Golay, M.J.E.: *Nature 160*, 435 (1957).
- 3.4. Schaller, H.: Kapillarsäulen für die Gas-Fest-Chromatographie. *LaborPraxis 12*, Nr. 11, 1252–1255 (1988).

- 3.5. Dandenau, R. und E. Zerenner: *HRC & CC* 2, 351 (1979).
- 3.6. Schaller, H.: Kapillarsäulen für die Gas-Fest-Chromatographie. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 60–67 (1989).
- 3.7. Houtermans, W. J. M. und H. Rohberg: *LaborPraxis* Juli/August 1983, 662.
- 3.8. Riederer, M.: Trennung permanenter Gase in der Adsorptions-GC. *LaborPraxis* 5, Nr. 7, 578–584 (1981).
- 3.9. Kaiser, R. E. und R. I. Rieder: *LaborPraxis* März 1986, 184.
- 3.10. Maurer, T. und W. Engenwald: Seriell gekoppelte Trennsäulen in der GC. *LaborPraxis* Juli/August 1990, 588.
- 3.11. Schaller, H.: Säulenschalten in der Kapillar-GC. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 94–98 (1988).
- 3.12. Molnar, I.: Computergestützte Optimierung in der Chromatographie. *LaborPraxis* 17, Nr. 12, 40–45 (1993).
- 3.13. Brodacz, W.: Computersimulation in der Gaschromatographie. *LABO* 26, Nr. 7–8, 4–13 (1995).
- 3.14. Traxler, H.: Präzisionsspritzen für Chromatographie und Dosiergerätetechnik. *LABO* 26, Nr. 7–8, 30–35 (1995).
- 3.15. Günther, W. und F. Schlegelmilch: *LaborPraxis* Oktober 1986, 680.
- 3.16. Grob, K. und K. Grob jr.: *J. Chromatogr.* 151, 311 (1978).
- 3.17. Sulzbach, H. und R. Magni: Quantitative Ultrapurengaschromatographie. *GIT Fachz. Lab.* 39, Nr. 9, 820–824 (1995).
- 3.18. Poy, F., S. Visani und F. Terrosi: *J. Chromatogr.* 217, 81 (1981).
- 3.19. Ridgeon, R. und H. Lillack: Universelles Probenaufgabesystem für Kapillarsäulen. *LaborPraxis* 17, Nr. 8, 22–27 (1993).
- 3.20. Straub, H.: Ein Injektor für zwei Probenaufgabetechniken. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 48–53 (1988).
- 3.21. Simmonds, J. G. und C.H. Stembridge: *J. Chromatogr. Sci.* 7, 36–41 (1969).
- 3.22. Reddmann, C. und H. Kurz: Pyrolyse-Kapillar-GC-FTIR-Kopplung. Ihre Anwendung auf technisch wichtige Elastomerwerkstoffe im Automobilbau. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 166–173 (1986).
- 3.23. Fischer, W. G.: *GIT Fachz. Lab.* 11, Heft 6, 562 (1967).
- 3.24. Merklein, K.: Pyrolyse als Probenvorbereitung. *LaborPraxis* 16, Nr. 2, 105–108 (1992).
- 3.25. Merklein, C: *LaborPraxis* Februar 1992, 105.
- 3.26. Lämmel, J. und J. W. Washall: Quantitative Aspekte der Pyrolyse GC bei der Analyse von Copolymeren. *GIT Fachz. Lab.* 37, Nr. 5, 430–433 (1993).
- 3.27. Lämmel, J. und J. Washall: Quantitative Analyse von Copolymeren via Pyrolyse/GC. *LaborPraxis* 17, Nr. 5, 36–39 (1993).
- 3.28. Halasz, I., *Anal. Chem.* 36, 1428 (1964).
- 3.29. Cremer, E. und F. Prior: *Z. Elektrochem.* 55, 66 (1951).
- 3.30. McWilliam, J. G. und R. A. Dewar: *Anal. Chem.* 29, 925 (1957).
- 3.31. Steinmüller, D. und D. Leonhard: Bestimmung von O-Additiven in Benzin mit dem OSD. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 70–74 (1988).
- 3.32. Lovelock, J.E.: *J. Chromatogr.* 1, 35 (1958).
- 3.33. Lovelock, J. E. und S.R. Lipsky: *J. Am. Chem. Soc.* 82, 431 (1960).
- 3.34. Lovelock, J. E.: The Electron Capture Detector – a personal Odyssey. *Chemtech*, September 1981, 531–537.

- 3.35. Lora-Tamayo, C., M. A. Rams und J. M. R. Chacón: Gas Chromatographie Data for 187 Nitrogen- or Phosphorous-Containing Drugs and Metabolites. *J. of Chromatography* 374, 73–85 (1986).
- 3.36. Hagmann, M. und B. Mohl: Spurenbestimmung von Stickstoff- und Phosphorpestiziden. *LaborPraxis* 17, Nr. 5, 56–62 (1993).
- 3.37. McGaughey, J. F. und S. K. Gangwal: *Anal. Chem.* 52, 2079–2083 (1980).
- 3.38. Quincoces, C. E. und M. G. Gonzalez: Characterization of the FPD in the Sulfur Mode. *Chromatographia* 20, June 1986, 371–375.
- 3.39. Farwell, S. O. und C. J. Barinaga: Sulfur-Selective Detection with the FPD. *J. of Chromatographic Science* 24, 483 (1986).
- 3.40. Dahlgran, J. R.: Simultaneous Detection of Total and Halogenated Hydrocarbons in Complex Environmental Samples. *J. of High Resolution Chromatography Communications*, 4, August 1981, 393–397.
- 3.41. Ehrlich, B.J., R. C. Hall und R.J. Anderson: Sulfur Detection in Hydrocarbon Matrices. *J. of Chromatographic Science*, May 1981, 19–23.
- 3.42. Driscoll, J. N.: Review of Photoionization Detection in Gas Chromatography. *J. of Chromatographic Science* 23, 488–492 (1985).
- 3.43. Andrawes, F. und R. Ramsey: The Helium Ionization Detector. *J. of Chromatographic Science*, 24, November 1986, 513–518.
- 3.44. Steinmüller, D. und H. Straub: *LaborPraxis* Mai 1989, 416.
- 3.45. Steinmüller, D. und H. Straub: Der Heliumionisationsdetektor für die Ultraspurenanalytik von Reinstgasen. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 21–24 (1990).
- 3.46. Hutte, R. S., R. E. Sievers und J. W. Birks: Gas Chromatography Detectors Based on Chemiluminescence. *J. of Chromatographic Science*, 24, November 1986, 499–505.
- 3.47. Nyarady, S.A., R.M. Barkley und R.E. Sievers: Redox Chemiluminescence Detector: Application to Gas Chromatography. *Anal. Chem.* 57, 2074–2079 (1985).
- 3.48. Schumacher, H.-J. und C. Eulig: Identifizierung unbekannter Peaks in Gaschromatogrammen. *LaborPraxis* 17, Nr. 4, 54–63 (1993).
- 3.49. Hirner, A. V.: Analytik von Umweltgasen mittels GC/ICP-MS. *GIT Fachz. Lab.* 39, Nr. 6, 524–527 (1995).
- 3.50. Davtes, N. W.: *J. Chromatogr.* 450, 388 (1988).
- 3.51. Gleispach, H., R. Moser, E. Hohenester, H.-J. Leis, B. Mayer und E. Malle: Festphasensäulen bei der Vorbereitung biologischer Proben zur Bestimmung mit GC-MS. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 54–59 (1987).
- 3.52. Hübschmann, H.-J.: MS/MS. Höchste Selektivität für die Spuren- und Rückstandsanalytik bei GC/MS-Analysen. *LABO* 26, Nr. 7/8, 42–49 (1995).
- 3.53. Matthiesen, U: *LABO* 19, Nr. 1, 7–11 (1988).
- 3.54. Stockinger, G.: GC/MS/MS – die ideale Technik zum Analysieren stark matrixbelasteter Proben. *LABO* 25, Nr. 7/8, 72–73 (1994).
- 3.55. Slayback, J. R. B. und P. A. Taylor: Analysis of 2,3,7,8-TCDD and 2,3,7,8-TCDF in Environment Matrices Using GC/MS/MS Techniques. *Spectra* 9, No. 4, 18–24 (1983).
- 3.56. Witek, H.: GC-FTIR Spektroskopie mit Kapillarsäulen. *LABO* 13, Nr. 5, 547–554 (1982).
- 3.57. Azarraga, L. V: *Appl. Spectrosc.* 34, 224 (1980).
- 3.58. Lautenschläger, W. und R. Wagner: Cryolect-GC-FT-IR-Technik. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 194–202 (1986).
- 3.59. Herres, W: Flavor Analysis by HRGC/FTIR. *J. of High Resolution Chromatography Communications* 6, 590 (1983).

- 3.60. Engewald, W, R. Reinhardt und G. Haufe: Isomerenidentifizierung. Kombinerter Einsatz von Kapillar-GC, GC-MS und GC-FTIR. *LaborPraxis* 16, Nr. 6, 634–640 (1992).
- 3.61. Gurka, D. F.: Rapid Non-Target Screening of Enviromental Extracts by Directly Coupled GC/FTIR/MS. *Anal. Chem.* 58, 2189 (1986).
- 3.62. Wilkins, C. L.: *Anal. Chem.* 59, 571A (1987).
- 3.63. Ciupe, R., J. Spangenberg, T. Meyer und G. Wild: Simultandetektion mit FID-ECD-MSD zur GC-Bestimmung halogenhaltiger Komponenten in Altöldestillaten und in biologischen Flüssigkeiten (Doping). *GTT Spezial Chromatographie* 15, Nr. 1, 29–31 (1995).
- 3.64. Wörmann, H., J. Stuth und J. Schulz: Nachweis von Einzelverbindungen in Deponiegas-Kondensat mit GC/MS- und GC/MS/IR-Kopplung. *GTT Fachz. Lab.* 37, Nr. 5, 400–403 (1993).
- 3.65. Ebdon, L. und S. Ward: Directly Coupled Gas Chromatography Atomic Spectroscopy. *Analyst* 111, 1113–1138 (1986).
- 3.66. Kusserow, B.: LC-GC-Kopplung. LC als direkt gekoppelte Probenvorbereitung für die GC. *LABO-TREND*, 64–72 (1995).
- 3.67. Krammer, G., A. Bernreuther und P. Schreier: Multidimensionale Gas-Chromatographie. *GIT Fachz. Lab.* 3, 306–311 (1990).
- 3.68. Schaller, H.: Zweidimensionale Kapillar-Gaschromatographie für die Spurenanalyse. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 11–15 (1990).
- 3.69. Kaiser, R.E. und R.I. Rieder: Serie: Multi-Chromatographie. *LaborPraxis* 9, Nr. 10, 1130 (1985); Nr. 11, 1318 (1985); Nr. 12, 1465 (1985); Nr. 1/2, 52 (1986); Nr. 3, 184 (1986); Nr. 4, 328 (1986); Nr. 7/8, 862 (1986); Nr. 9, 1014 (1986); Nr. 10, 1133 (1986).
- 3.70. Müller, R, M. Oreans und R. Weeke: Neuartige Säulenschaltung nach dem Live Prinzip. *LaborPraxis* 5, 462–472 (1982).
- 3.71. Müller, H.: Multidimensionale GC. Reaktorganalyse mit einem Doppelofen-Gaschromatographen. *LaborPraxis* 12, Nr. 6, 654–656 (1988).
- 3.72. Maurer, T. und W. Engewald: Seriell gekoppelte Trennsäulen in der GC. *LaborPraxis* 14, Nr. 7, 588–594(1990).
- 3.73. Deans, D.R.: *J. Chromatogr.* 1, 28 (1967).
- 3.74. David, W.: Gaschromatographie. Alte Ideen – erfolgreich neu kombiniert. *LABO* 7/8, 62–68 (1994).
- 3.75. Stockinger, G.: Hochtemperatur-Gaschromatographie. Eine neue Dimension in der GC. *LABO* 20, Nr.7, 42–47 (1989).
- 3.76. Drozd, J. und J. Novak: Headspace Gas Analysis by Gas Chromatography. *J. Chromatogr.* 165, 141 (1979).
- 3.77. Huber, L.: *LaborPraxis* März 1984, 152.
- 3.78. Rinne, D. und C. Bieber: GC-Head-Space für leichtflüchtige Halogenkohlenwasserstoffe. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 6–14 (1986).
- 3.79. Gerhards, R: *LaborPraxis* Oktober 1991, 835.
- 3.80. Gerhards, R: Benzolbestimmung im Boden. *LaborPraxis* 16, Nr. 10, 835–838 (1991).
- 3.81. Kolb, B.: *LaborPraxis* März 1982, 156.
- 3.82. Schlegelmilch, F.: Erfassung flüchtiger Schadstoffe in Umweltproben. *LaborPraxis* 14, Nr. 9, 724–728 (1990).
- 3.83. Lämmel, J. und J. Washall: Purge & Trap-Analytik bei Lebensmitteln. *LaborPraxis* 16, Nr. 12, 1214–1216 (1992).

- 3.84. Schlegelmilch, F.: Anreicherungsrührchen ARR in der dynamischen Headspace-GC. *LaborPraxis 16*, Nr. 11, 1100–1105 (1992).
- 3.85. Schlegelmilch, F.: Das ATD-Meßsystem erfaßt flüchtige Schadstoffe in Bodenproben. *LaborPraxis 16*, Nr. 6, 588–594 (1992)
- 3.86. Schlegelmilch, F. *LaborPraxis* Januar 1992, 16.
- 3.87. Müller, H.: Multidimensionale GC, Reaktorganalyse mit einem Doppelofen-Gaschromatographen. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 40–43 (1989).
- 3.88. Bingewski, F.: Analytik total. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 43, Nr. 6, 676–679 (1995).
- 3.89. Anderbrügge, T. und H. Kaesler, *Gas Wärme international 41*, Heft 1, 29 (1992).
- 3.90. Matz, G. und W. Schröder: Boden-Schnell-Analytik. Die Erkundung von Altlasten im Feld mit GC/MS-System. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 78–81 (1990).

- 4.1. Jansen, K.-H.: LC-Flexibilität made in Germany. Ein umfassendes Chromatographiekonzept für Komponenten und Systeme. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 44–57(1986).
- 4.2. Matthew, J., L. R. Zieske, W. Kinsey und J. M. Schaefer: Systembedingte Metallionen-Kontamination in der HPLC. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 60–63 (1987).
- 4.3. Barka, G.: Konstante Temperatur in der HPLC. *LaborPraxis 17*, Nr. 8, 28–31 (1993).
- 4.4. Funke, H.: Eluentenfördersysteme in der HPLC. Technik der HPLC-Pumpen. *LaborPraxis 8*, Nr. 1/2, 18–29 (1984).
- 4.5. Glatz, B. und L. Huber: Test von Lösungsmittelfördersystemen in der HPLC. *LaborPraxis Special: Chromatographie Spektroskopie*, 26–31 (1987)
- 4.6. Stubba, W.: Eluentenentgasung mit gaselektiven Membranen. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 43–49 (1990).
- 4.7. Gertz, Ch.: Optimierungsverfahren in der HPLC. *LaborPraxis 16*, Nr. 6, 642–653 (1992).
- 4.8. Jost, W., G. Schwinn und M. Tüylü: Hydrophil gebundene stationäre Phasen in der HPLC. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 8–12 (1988)
- 4.9. Suck, T. A.: Absolute Molekulargewichtsbestimmung in der Ausschlußchromatographie. *LaborPraxis 14*, Nr. 3, 116–128 (1990).
- 4.10. Gratzfeld-Huesgen, A.: Was die GeLaborPraxisermeationschromatographie heute leisten kann. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 83–89 (1988).
- 4.11. Bischoff, K.: Mehr Informationen bei der Proteintrennung mittels HPLC. *LaborPraxis Special Chromatographie/Spektroskopie '87*, 6–10.
- 4.12. Schwedt, G.: Hard- und Software in der HPLC. *LaborPraxis 7*, Nr. 6, 566–572 (1983).
- 4.13. Meister, J. und H. Engelhardt: HPLC-Detektoren. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 40, Nr. 10, M1–M37(1992).
- 4.14. Hiller, E. und M. Kühne-Wächter: Mit Photodiodenarray-Technik einen Schritt weiter. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 14–21 (1988).
- 4.15. Steinwand, M.: Diodenarray-Detektion in der HPLC mit der Empfindlichkeit eines variablen UV-Detektors. *LaborPraxis 11*, Nr. 11, 1304–1311 (1987).
- 4.16. Webster, G.: Diodenarray-Detektoren – mehr als nur Dioden! *GITFachz. Lab.* 38, Nr. 1, 42–43 (1994).
- 4.17. Steinwand, M.: Diodenarray-Detektion in der HPLC mit der Empfindlichkeit eines variablen UV-Detektors. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 90–92 (1988).

- 4.18. Webster, G.: Ist der DAD künftiger Standard im QC-Labor? *LaborPraxis* 19, Nr. 10, 68–77 (1995).
- 4.19. Vonach, B.: Peak-Reinheitskontrolle in der HPLC mit Diodenarray-Detektion. *LaborPraxis* 15, Nr. 7/8, 634–636 (1991).
- 4.20. N. N.: Multikomponentenanalyse in der HPLC. Quantifizierung nicht getrennter Komponenten. *LaborPraxis* 16, Nr. 9, 914–916 (1992).
- 4.21. Ringhardt, I.: Fluoreszenzdetektoren in der HPLC. *LaborPraxis* 3, Nr. 12, 26–32 (1979).
- 4.22. Kinkeldei, J., W. Hausotter und K. H. Bareiss: Bestimmung von PAKs mit HPLC und UV/FL-Detektion. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 37–42 (1990).
- 4.23. Glozbach, E. A., J. J. Franken und B. OomS: Elektrochemische Detektion in der HPLC. *LaborPraxis* 5, Nr. 9, 690–697 (1981).
- 4.24. Wenkel, N.: Elektrochemische Detektion in der HPLC. *LaborPraxis* 14, Nr. 1/2, 46–50 (1990).
- 4.25. Frischkorn, C. G. B., P. Schlegel und B. Vonach: Elektrochemische Detektion – Neuere Anwendungen. *LaborPraxis Special Chromatographie/Spektroskopie* '88, 44–47.
- 4.26. Gerhardt, H.: Lichtstreuendetektoren für die HPLC. *LaborPraxis* 13, Nr. 9, 742–745 (1989).
- 4.27. Schwedt, G. und A. Meyer: Kopplungstechniken in der Chromatographie. *LaborPraxis* 16, Nr. 7, 712–714 (1992).
- 4.28. Levsen, K.: Kopplung Hochleistungs-Chromatograph – Massenspektrometer (HPLC-MS). *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 31, Nr. 10, 782–784 (1983).
- 4.29. Kaudewitz, H.: Das Massenspektrometer als HPLC-Detektor. *LaborPraxis* 16, Nr. 7, 730–733 (1992).
- 4.30. Krien, P., G. Devant und M. Hardy: Application of Microbore Columns to Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr.* 251, 129–139 (1982).
- 4.31. Schubert, R.: Thermospray LC/MS. *GIT Fachz. Lab.* 28, Nr. 6, 323–325 (1984).
- 4.32. Volmer, D.: Thermospray HPLC-MS-Analyse von Pestiziden in wäßrigen Umweltproben. *GIT Fachz. Lab.* 38, Nr. 1, 16–24 (1994).
- 4.33. Albert, K.J. *Chromatogr.* 436, 355–363 (1989).
- 4.34. Hofmann, M., M. Spraul, R. Streck, I. D. Wilson und A. Rapp: LC-NMR-Kopplung und ihre Anwendungen. *LaborPraxis* 17, Nr. 10, 36–41 (1993).
- 4.35. Schmarr, H.-G.: Online-Kopplung von HPLC und GC. *LaborPraxis* 16, Nr. 7, 716–721 (1992).
- 4.36. Böcker, J. W. und K. zerweck: Voraussetzungen zur automatischen Badsteuerung – Beispiel aus der Nickelgalvanofornung. *Galvanotechnik* 75, Nr. 2, 150–158 (1984).
- 4.37. Nosko, S. und D. Burger: Recycling von Lösungsmittel-Gemischen. Acetonitril-Abfälle. *LaborPraxis* 17, Nr. 2, 51–55 (1993).
- 4.38. Salamoun, J.: Mikro-LC mit gepackten Kapillarsäulen. *LaborPraxis* 17, Nr. 9, 36–39 (1993).
- 4.39. Horvath, C. und S. R. Lipsky: *Anal. Chem.* 41, 1277–1234 (1969).
- 4.40. Yang, F. J.: Microbore Column HPLC. *J. HRC & CC* Vol 6, 348.358, July 1983.
- 4.41. Linscheid, M. und C. Randt: Anwendung von konventioneller und Mikro-HPLC. *LaborPraxis* 10, Nr. 10, 1118–1128 (1986).
- 4.42. Beinert, W.-D.: Prinzipien und Vorteile der Narrow-Bore-HPLC. *GIT Spezial Chromatographie* 14, 17–20 (1994).
- 4.43. Apfel, H.: HPLC ohne Pumpe? Eine neue Konzeption für die Mikro-HPLC. *LaborPraxis* 12, Nr. 11, 1244–1251 (1988).

- 4.44. Franke, G.: PCLC im 10-Minuten-Takt. *LaborPraxis 12*, Nr. 6, 644–652 (1988).
- 4.45. Henke, H.: Präparative Niederdruck-LC in der Praxis. *LaborPraxis 19*, Nr. 2, 62–69 (1995).
- 4.46. Common, G.: Ein durchdachtes LC-Konzept. *LaborPraxis 19*, Nr. 8, 54–58 (1995).
- 4.47. Krohn, J. und G. Franke: Fraktionssammler in automatischen, präparativen HPLC-Systemen. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 40–45 (1987).
- 4.48. Kissler, B.: Glassäulen in der präparativen Mitteldruckchromatographie. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 34–37 (1991).
- 4.49. Schwedt, G.: HPLC-Meßplatz für Lebensmittelanalysen. *LaborPraxis 13*, Nr. 11, 988–990 (1989).
- 4.50. Janssen, A., M. Keuter, D. Meyer zu Altenschildesche, A. Ritzkopf und W. Treder: Chromatographische Pestizidbestimmung entsprechend der Trinkwasserverordnung. Teil II: Gaschromatographische und flüssigkeitschromatographische Bestimmung. *GIT Fachz. Lab. 39*, Nr. 6, 516–523(1995).
- 4.51. Wetteroth, A., S. Windmann und W. Windmann: EDV-unterstützte Qualitätssicherung in der Analytik am Beispiel der HPLC. *GIT Fachz. Lab. 39*, Nr. 3, 240–245 (1995).
- 5.1. Unger, K.K.: *GIT Spezial Chromatographie 11*, 3 (1991).
- 5.2. Engler, R.: Neue Arbeitstechniken in der Dünnschicht-Chromatographie. *LaborPraxis 6*, Nr. 10, 1346–1354(1982).
- 5.3. Hauck, H.-E., A. Junker-Buchheit, R. Wenig und St. Schömer: LaborPraxis in der Chromatographie – Reproduzierbarkeit in der Dünnschicht-Chromatographie. *Labor 2000*, Ausgabe 1995, 70–72 und 105–106.
- 5.4. Jung, W: Silikagel, Steckbrief eines Adsorptionsmittels. *LABO 13*, Nr. 5, 503–507 (1982).
- 5.5. Smuda, H.: Cellulosederivate für die hydrophobe Chromatographie. *GIT Fachz. Lab. 39*, Nr. 4, 357(1995).
- 5.6. Schmutz, H.-R.: Instrumentelle Dünnschicht-Chromatographie. *LaborPraxis 6*, Nr. 1, 38–47(1982).
- 5.7. Perry, J. A., K.W Haag und L.J. Glunz, J.: *Chromatogr. Sei. 11*, 447 (1973).
- 5.8. Burger, K.: *Fresenius Z. Anal. Chem.* 318, 228–233 (1984).
- 5.9. Lodi, G., A. Betti, E. Menziani, V. Brandolini und B. Tosi: *J. Planar Chromatogr.* 4, 106–110 (1991).
- 5.10. Jänchen, D.E.: Instrumentelle Mehrfachentwicklung von Chromatogrammen in der HPTLC. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 104–109 (1986).
- 5.11. De la Vigne, U.: Ultra-Spuren-Analyse von Pestiziden in Wasser. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 68–75 (1991).
- 5.12. Kaiser, R. E. und M. Prosek: Neuere Methoden der Quantifizierung in der Planar-Chromatographie. *LABO 21*, Nr. 3, 7–12 (1990).
- 5.13. Spangenberg, B., St. Stehle und Ch. Strubele: Quantitative DC mit einem Handscanner: CO²⁺-Bestimmung. *GIT Fachz. Lab. 39*, Nr. 5, 461–464 (1995).
- 5.14. Ebel, S., E. Geitz und D. Klarner: Einführung in die quantitative DC: Grundlagen, Möglichkeiten, Automatisierung (Teil 2). *Kontakte 2/80*, 12–16.
- 5.15. Kaiser, R. E. und M. G. Prosek: Integration in der quantitativen HPTLC? *LaborPraxis 6*, Nr. 4, 310–322(1982).
- 5.16. Kovar, K.-A., J. Dinkelacker, A.M. Pfeiffer, W. Pisternick und A. Wössner: Identifizierung von Suchtstoffen mit Hilfe der HPTLC-UV/FTIR-Kopplung. *GIT Spezial Chromatographie 15*, Nr. 1, 19–24 (1995).
- 5.17. Mörsel, J.-T., M. Huth und K. Seifert: Lebensmittelbestrahlung – Nachweis durch gekoppelte DC-HPLC. *LaborPraxis 19*, Nr. 3, 24–26 (1995).

- 5.18. Kaiser, R. E.: Wozu brauchen wir Planar-Chromatographie – wir haben doch HPLC! *LABO Analytik*, 7–15 (1989).
- 5.19. Kelker, H.: Dünnschicht oder Säulenflüssigkeits-Chromatographie? *Nachr. Chem. Tech. Lab. 31*, Nr. 10, 786(1983).
- 5.20. De la Vigne, U.: Dopingkontrolle mit der HPTLC. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 25–32 (1990).
- 6.1. Small, H., T. S. Stevens und W. C. Bauman: *Anal. Chem.* 47, 1801 (1975)
- 6.2. Hoffmann, H.-J.: Die erste IC-Norm in der Wasseranalytik. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 99–103 (1988).
- 6.3. Iskandarani, A. und D. J. Pietrzyk: *Anal. Chem.* 54, 1065 (1982).
- 6.4. Jost, W., R. Spatz, R. Ditz und F. Eisenbeiss: *LaborPraxis* Oktober 1984, 1018.
- 6.5. Skelly, N.E.: *Anal. Chem.* 54, 712 (1981).
- 6.6. Schwedt, G.: *LaborPraxis* Januar/Februar 1984, 30.
- 6.7. Schönmakers, P. J., H. A. H. Billiet und L. DeGalan: *J. Chromatogr.* 282, 107 (1983).
- 6.8. Schäfer, J.: Analysenprobleme einfach gelöst mit Ionenchromatographie. *GIT Fachz. Lab.* 32, 221–228 (1988).
- 6.9. Gjerde, D.T., J. S. Fritz und G. Schmuckler: *J. Chromatogr.* 186, 509 (1979).
- 6.10. Metrohm Presse-Information: *Ionenchromatographie – «to suppress or not to suppress»*. Metrohm AG, Herisau/Schweiz, 9/95.
- 6.11. Kaufmann, M., T. Schwarz und P. Bartholmes: Continuous Buffer Exchange of Column Chromatographie Eluates Using a Hollow-Fibre Membrane Module. *J. Chromatogr.* 639, 33–39 (1993).
- 6.12. Henshall, A., S. Rabin, J. Statler und J. Stillian: *International Laboratory 12*, Jan/Febr 1993, 7.
- 6.13. Jensen, D.: Bestimmung ionischer Verunreinigungen in konzentrierten Säuren und Laugen. *GIT Fachz. Lab.* 4/95, 332–339.
- 6.14. Behnert, J., P. Behrend und A. Kipplinger: Vorteile der Einsäulentechnik in der IC. *LaborPraxis* August 1986, 872.
- 6.15. Gjerde, D. T., J. S. Fritz und G. Schmuckler: *J. Chromatogr.* 186, 509 (1979).
- 6.16. Glatz, J. A. und J. E. Girard: *J. Chromatog. Sei.* 20, 266 (1982).
- 6.17. Wheaton, R. W. und W. C. Bauman: *Ind. Eng. Chem.* 45, 1801 (1953).
- 6.18. N. N.: Ionenausschluß-Chromatographie. Bestimmung von organischen Säuren in Früchten und Säften. *LaborPraxis 17*, Nr. 1, 37 (1993).
- 6.19. Bischoff, K.: *LaborPraxis* August 1984, 506.
- 6.20. Bischoff, K.: Mehr Informationen bei der Proteintrennung mittels HPLC. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 6–10 (1987).
- 6.21. Heisz, O.: Detektionsverfahren in der Ionenchromatographie. *GIT Fachz. Lab.* 2/85, 112–113.
- 6.22. Göbl, M.: *GIT Fachz. Lab.* 27, 261 (1983).
- 6.23. Hughes, S. R., P. L. Meschi und D. C. Johnson: *Anal. Chim. Acta* 132,1 (1981).
- 6.24. Hughes, S., P. L. Meschi und D. C. Johnson: *Anal. Chim. Acta* 132,1 (1981).
- 6.25. Frischkorn, C. G. B., P. Schlegel und B. Vonach: Elektrochemische Detektion – Neuere Anwendungen. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 44–47 (1988).
- 6.26. Bond, A. M., I. D. Heritage, G. G. Wallace und M. J. McCormick: *Anal. Chem.* 54, 582 (1982).
- 6.27. Edwards, R. und K. Haag: *Am. Lab.*, April 1983.

- 6.28. Solbrig-Lebuhn, H.: Kohlenhydratanalytik. Anionenaustauschchromatographie mit gepulster elektrochemischer Detektion (HPAE-PAD). *LaborPraxis* 16, Nr. 8, 786–789 (1992).
- 6.29. Jansen, C.: Neuere Entwicklungen in der HPLC von Kohlenhydraten. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 6–10 (1990).
- 6.30. Cochrane, R. A., und D. E. Hillman: Analysis of Anions by Ion Chromatography Using Ultraviolet Detection. *J. Chromatogr.* 241, 392–394 (1982).
- 6.31. Skelly, N. E.: *Anal. Chem.* 54, 712 (1981).
- 6.32. Stetzenbach, K. J. und G. M. Thomson: *Gmund Water* 21, 36 (1983).
- 6.33. Small, H. und T. E. Miller jr.: Indirect Photometrie Chromatography. *Anal. Chem.* 54, 462–469 (1982).
- 6.34. Heisz, D.: *GIT Fachz. Lab.* 27, 596 (1983).
- 6.35. Jensen, D. und W. Blödorn: Vereinfachte Speziesanalytik durch Kopplung von Ionenchromatographie mit ICP-OES und ICP-MS. *GIT Fachz. Lab.* 39, Nr. 7, 654–661 (1995).
- 6.36. Seubert, A.: Online-Kopplung HPLC/ICP-MS in der Elementanalytik. *GIT Fachz. Lab.* 39, Nr. 6, 528–534 (1995).
- 6.37. Schwedt, G.: *LaborPraxis* Juli/August 1991, 630.
- 6.38. Bogenschütz, G., U. Loyall und J. Schäfer, *LaborPraxis* März 1990, 120.
- 6.39. Schwedt, G., D. Yan und W. Gebhardt: *LaborPraxis* November 1991, 976.
- 6.40. Bogenschütz, G., U. Loyall und J. Schäfer: Anorganische Ionenanalytik mit der Ionenchromatographie. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 6–13 (1991).
- 6.41. Resch, G. und E. Grünschlager: *VGB Kraftwerkstechnik* 62, 127 (1982).
- 6.42. Ott, D.: *Galvanotechnik* 76, Heft 10, 1434 (1985).
- 6.43. Herrmann, J.: Analyse von Badzusätzen mittels HPIC und HPLC. *Galvanotechnik* 76, Nr. 10, 1432–1433 (1985).
- 6.44. Breitkopf, K.: Nitrat in aller Munde! Eine Methodenbeschreibung für die Bestimmung von Nitrat in Gemüse. *LaborPraxis* 19, Nr. 3, 28–3 (1995).
- 6.45. Tracy, M. L., M. V. Pickering und Th. VerHulst: Cation-Exchange Chromatography – Analysis of Foods and Beverages of Biogenic Amines. *GIT Spezial Chromatographie* 15, Nr. 1, 55–59 (1995).
- 6.46. Juergens, U.: Einsatz der Ionenchromatographie in der klinischen Chemie. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 16–18 (1991).
- 6.47. Yan, Daren und G. Schwedt: Nierensteinanalyse mittels Ionen-Chromatographie. *LaborPraxis* 14, Nr. 9, 720–723 (1990).
- 6.48. Juergens, U.: *LaborPraxis* März 1990, 126.
- 7.1. Wojtusik, M. J.: SUR/FIN '93, *International Technical Conference Proceedings*, June 21–24, 1993, 61–67.
- 7.2. Karger, B. L., A. S. Cohen und A. Guttman: Capillary Electrophoresis. *Science* 242, 224–228 (1988).
- 7.3. Kuhr, W. G.: *Anal. Chem.* 64, 389R (1992).
- 7.4. Dovtchi, N. J.: *J. Chromatogr.* 117, 608 (1992).
- 7.5. Ewing, A. G., R. A. Wallingford und T. M. Olefirowicz: Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 61, 292A–303A (1989).
- 7.6. Tiselius, A.: *Trans. Faraday Soc.* 33, 524 (1937).
- 7.7. Jorgenson, J. W.: *Science* 222, 266–272 (1983).

- 7.8. Schneider, H.-J.: Kapillarelektrophorese. Eine neue, hochauflösende Trennmethode. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 50–51 (1990).
- 7.9. Beck, W.: Kapillarelektrophorese. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 41, Nr. 3, M1–M6 (1993).
- 7.10. Jandik, R., W. R. Jones, A. Weston und P. R. Brown: Electrophoretic Capillary Ion Analysis: Origins, Principles, and Application. *LC/GC Internat.* 5, 20–27 (1991).
- 7.11. Josic, D. und K. Zeilinger: Hochleistungskapillarelektrophorese zur Trennung von Peptiden und Proteinen. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 63–64 (1990).
- 7.12. Lukacs, K. D. und J.W. Joergenson: Capillary Zone Electrophoresis: Effect of Physical Parameters on Separation Efficiency and Quantitation. *J. High Res. Chromatogr.* 8, 407–411 (1985).
- 7.13. Van Orman, B. B., G. G. Liversidge, G. L. McIntyre, T. M. Olefirowicz und A. G. Ewing: Effect of Buffer Composition on Electroosmotic Flow in Capillary Electrophoresis. *J. Microcolumn Sep.* 2, 176–180 (1990).
- 7.14. Verheggen, T. A. C. Schoots und F. M. Evearts: Feasibility of Capillary Zone Electrophoresis with Suppression of Electroosmotic Flow in Completely Closed Systems. *J. Chromatogr.* 503, 245–255 (1990).
- 7.15. Terabe, S., K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya und T. Ando: *Anal. Chem.* 56, 111–113 (1984).
- 7.16. Terabe, S.: Electrokinetic Chromatography: an Interface between Electrophoresis and Chromatography. *Trends Anal. Chem.* 8, 129–134 (1989).
- 7.17. Bächmann, K., A. Bazzanella, B. Göttlicher, I. Haag, K.-Y. Han, R. Arnecke und V. Böhmer: Neue pseudostationäre Phasen in der Elektrokinetischen Chromatographie. *GIT Spezial Chromatographie* 15, Nr. 2, 96–103 (1995).
- 7.18. Zhu, M., V. Levi, T. Wehr und W. Blum: Trennung von Proteinen nach Molekulargewicht per CE. *LaborPraxis* 17, Nr. 10, 24–25 (1993).
- 7.19. Wittmann-Liebold, B., H. Solbrig-Lebuhn und P. Jungblut: Hochauflösende 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. *LaborPraxis* 19, Nr. 10, 34–40 (1995).
- 7.20. Wehr, T. M. Zhu, R. Rodriguez, D. Burke und K. Duncan: High Performance Isoelectric Focussing Using Capillary Electrophoresis Instrumentation. *Am. Biotechnol. Lab.* 8, 22–27 (1990).
- 7.21. Smuda, H.: Präparative elektrophorese im Gramm-Maßstab. *GIT Fachz. Lab.* 37, Nr. 9, 780 (1993).
- 7.22. Westermeier, R., W. Postel und A. Görg: Elektrophorese – Stand und Trends elektrophoretischer Trennverfahren. *LABO* 13, Nr. 10, 1159–1170 (1982).
- 7.23. Schwedt, G. und J. Harms: Kapillar-Elektrophorese mit scannendem UWVTS-Detektor. *LaborPraxis* 17, Nr. 3, 51–52 (1993).
- 7.24. Lauer, H.H. und K. Bischoff: Kapillarelektrophorese. Variable Injektionsvorrichtung für diese hochauflösende Trennmethode. *LaborPraxis* 16, Nr. 11, 1126–1130 (1992).
- 7.25. Chien, R. L. und D. S. burgi: Field-Amplified Sample Injection in High Performance Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr.* 559, 142–151 (1991).
- 7.26. Jandik, R. und W. R. Jones: *J. Chromatogr.* 546, 431 (1991).
- 7.27. Brehm, G. und H. Gössner: Kapillarelektrophorese für die schnelle Analytik synthetischer Peptide. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 29–32 (1991).
- 7.28. Camman, K., W. Kleiböhmer und E. Mussenbrock: Die mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie, eine Konkurrenz für die HPLC? *GIT Fachz. Lab.* 38, Nr. 3, 162–170 (1994).

- 7.29. Harrold, M., M.J. Wojtusik, J. Riviello und P. Henson: *J. Chromatogr.* 548, 313 (1993).
- 7.30. Weiss, J. und D. Hauffe: Kapillarelektrophorese anorganischer Anionen und organischer Säuren mit Leitfähigkeitsdetektion. *GIT Spezial Chromatographie* 2/94, 57–63.
- 7.31. Jones, W. R. und P. Jandik: *J. Chromatogr.* 546, 445 (1991).
- 7.32. Schiewe, J., M. Dabrunz und H.-P. Abicht: Kapillarelektrophorese – eine moderne Methode zur Charakterisierung von Keramikausgangsmaterialien. *GIT Fachz. Lab.* 38, Nr. 4, 304–306 (1994).
- 7.33. Buchberger, W.: Kapillarzonenelektrophorese zur Ionenbestimmung. *GIT Fachz. Lab.* 38, Nr. 6, 635–636 (1994).
- 7.34. Schurig, V., S. Mayer und H. Jakubetz: Strategien zur chiralen Diskriminierung durch Elektromigration in kapillaren. *GIT Spezial Chromatographie* 15, Nr. 1, 5–8 (1995).
- 8.1. Klesper, E., A. E. Corwin und D. A. Turner: *J. Org. Chem.* 27, 700 (1962).
- 8.2. Later, D. W., B. E. Richter und M. R. Andersen: *LC-GC Magazine for Liquid and Gas Chromatography* 4, 10 (1987).
- 8.3. Klesper, E. und EP. Schmitz: *J. Chromatogr.* 402,1 (1988).
- 8.4. Wenclawiak, B.: *Fresenius Z. Anal. Chem.* 330, 218 (1988).
- 8.5. Becker, K.: Kopplung von Kapillar-SFC mit Massenspektrometern. *GIT Fachz. Lab.* 39, Nr. 5, 432–433 (1995).
- 8.6. Braumann, U., L.-H. Tseng, K. Albert und M. Spraul: Kopplung von chromatographischen Methoden mit ¹H-NMR als Detektor. *GIT Fachz. Lab.* 38, Nr. 2, 77–79 (1994).
- 8.7. Häufel, J., H. Creutzmacher und W. Weisweiler: Analyse von PAK in Bodenproben. Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gegen überkritische Fluide. *GIT Fachz. Lab.* 38, Nr. 7, 764–768 (1994).
- 8.8. Allada, S. R.: Solubility Parameters of Supercritical Fluids. *Ind. Eng. Chem. Proc.* 23, Nr. 2, 344–348 (1984).
- 8.9. Hawthorne, S.B.: Analytical-Scale Supercritical Fluid Extraction. *Anal. Chem.* 62, Nr. 11, 633A–642A (1990).
- 8.10. Paschke, T., B. von Lintig und B. Wenclawiak: *Chem. Lab. Betr.* 43, 366 (1992).
- 8.11. Wenclawiak, B. und T. Paschke: überkritische Fluid-Extraktion – Möglichkeiten und Trends. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 41, Nr. 7/8, 806–810 (1993).
- 9.1. Schwedt, G.: Analytische Qualitätssicherung. *LaborPraxis* 14, Nr. 4, 216–220 (1990).
- 9.2. Capers, N., P. Hartmann und S. S. Schmidt: Genauigkeit in der genormten Wasseranalytik. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 42, Nr. 6, 601–604 (1994).
- 9.3. Schreiber, M.: Trends im analytischen Qualitätskontroll-Labor. *GIT Fachz. Lab.* 37, Nr. 9, 769–772 (1993).
- 9.4. Schwedt, G.: Analysendaten – richtig oder falsch? *LaborPraxis* 17, Nr. 5, 44–46 (1993).
- 9.5. Günther, W.: LaborPraxis und Akkreditierung: Qualitätssicherung, DIN-, EPA-, VDI-Vorschriften? *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 41, Nr. 2, S16–S21 (1993).
- 9.6. Kneucker, D.: Qualität beginnt im Kopf. *Labor 2000*, Ausgabe 1995, 3.
- 9.7. Böttger, D.: Vorbereitung eines Prüflabors auf die Akkreditierung. *GIT Fachz. Lab.* 39, Nr. 6, 553–554 (1995).
- 9.8. Mandelatz, K.: Akkreditierung oder LaborPraxis? *Labor 2000*, Ausgabe 1995, 58–62.
- 9.9. Walter, E.: DIN-ISO Qualitätssicherungsnormen im Vergleich zu GMP-Regeln. *Pharm. Ind.* 56, Nr. 5, 425 (1994).
- 9.10. Fischbach, R.: Die Akkreditierung im Kontext mit Zertifizierung und GLaborPraxis. *GIT Fachz. Lab.* 39, Nr. 5, 448–449 (1995).

- 9.11. Schuchardt, K.: Labor-Informations- und Management-Systeme. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 40, Nr. 11, M1–M20 (1992).
- 9.12. Schulte, H.: LIMS. Planung und Einführung eines Labor-Informations-Management-Systems. *LaborPraxis* 16, Nr. 12, 1231–1234 (1992).
- 9.13. Hörner, E., H.-P. Klur und J. Kuhle: Trends in der LIMS-Entwicklung. *GIT Fachz. Lab.* 38, Nr. 6, 695–696 (1994).
- 9.14. Jonak, R.: Auswahl und Einführung eines LIMS. *GIT Fachz. Lab.* 37, Nr. 9, 734–738 (1993).
- 9.15. Peuker, A.: LIMS-Validierung. Planung, Durchführung und Hilfsmittel einer LIMS-Validierung. *GIT Fachz. Lab.* 37, Nr. 9, 729–733 (1993).
- 9.16. Paul, R. und J. Seufert: Niemand bleibt eine Insel – LIMS in die Unternehmensweite EDV integrieren. *LaborPraxis* 16, Nr. 12, 1226–1230 (1992).
- 9.17. Mayer, H. J.: Labor-Informations- und Management-Systeme als Werkzeug in der Qualitätssicherung. *GIT Fachz. Lab.* 37, Nr. 10, 881–888 (1993).
- 9.18. Schmidt, C: SmartLIMS – Bericht eines Anwenders. *LaborPraxis* 19, Nr. 2, 70–73 (1995).
- 9.19. Misroch, M. M. und D. Lipinski: Planung und Beurteilung eines LIMS. *LaborPraxis* 14, Nr. 5, 340–342 (1990).
- 9.20. Nölte, J.: Analyse von Bodenproben mit der ICP-AES. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 81–82 (1990).
- 9.21. Lipinski, D.: Moderner Arbeitsablauf im Wasserlabor. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 74–77 (1990).
- 9.22. Hoffmann, H.-J.: Umweltanalytik in Wasser, Boden und Luft. *LaborPraxis Special: Chromatographie/Spektroskopie*, 72–73 (1990).
- 9.23. Soth, J., R. Ketelhut und M. Braungart: Ökobilanzen – Ein Instrument zur Verbesserung der Produktqualität. *Metalloberfläche* 49, Nr. 10, 792–795 (1995).
- 9.24. Lund, W, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 337, 557 (1990).
- 9.25. Kromidas, S., R. Klinker und R. Mertens: Methodenvalidierung im analytischen Labor. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 43, Nr. 6, 669–676 (1995).
- 9.26. Rohrer, Ch., und W. Wegscheider: Computerunterstützung für die Methodenvalidierung in der analytischen Chemie. *GIT Fachz. Lab.* 38, Nr. 6, 688–691 (1994).
- 9.27. Maelicke, A.: Analytische und juristische Aspekte des Grenzwertkonzepts. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 43, Nr. 11, 1190–1198 (1995).
- 9.28. Pitsch, H.: Probennahme und Probenteilung. *GIT Fachz. Lab.* 37, Nr. 12, 1102–1104 (1993).
- 9.29. Büttner, W., J. Dahmen, N. Harder und J. Heckenkamp: Kontamination bei der Probennahme ultrareiner Chemikalien. *GIT Fachz. Lab.* 37, Nr. 10, 992–996 (1993).
- 9.30. Hoffmann, R.: Probennahme. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 40, Nr. 12, M1–M32 (19).

Дополнительная литература

К главе 2:

- Dyson, N.: *Chromatographie Integration Methods*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1990.
- Said, A. S.: *Theory and Mathematics of Chromatography*. Heidelberg, Basel, New York: Hüthig-Verlag, 1981.
- Schwedt, G.: *Chromatographische Trennmethoden*. Theoretische Grundlagen, Techniken und analytische Anwendungen. Stuttgart: Thieme-Verlag, 1994. Wintermeyer, U.: *Die Wurzeln der Chromatographie*. Darmstadt: GIT-Verlag, 1989.

К главе 3:

- Baars, B. und H. Schaller: *Fehlersuche in der Gaschromatographie*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft mbH, 1994.
- Bertsch, W., H. Frank, W. G. Jennings und P. Sandra: *Chromatographie Methods*. Heidelberg: Hüthig-Verlag, 1993.
- Gottwald, W.: *GC für Anwender*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft mbH, 1994.
- Grob, K.: *On-Line Coupled LC-GC*. Heidelberg: Hüthig-Verlag GmbH, 1991.
- Grob, K.: *On-Column Injection in Capillary Gas Chromatography*. Heidelberg: Hüthig-Verlag, 1990.
- Günther, W. und F. Schlegelmilch: *Gaschromatographie mit Kapillartrennsäulen*. Würzburg: Vogel-Verlag, 1990.
- Hachenberg, H. und A. P. Schmidt: *Gas Chromatographie Headspace Analysis*. London: Heyden, 1977.
- Jennings, W. G. und A. Rapp: *Sample Preparation for Gas Chromatographie Analysis*. Heidelberg: Hüthig-Verlag.
- Leibnitz, E. und H. G. Struppe: *Handbuch der GC*. Weinheim: Verlag Chemie.
- Markides, K. E. und M. L. Lee: *Advances in Capillary Chromatography*. Heidelberg: Hüthig-Verlag, 1986.
- Matter, L.: *Lebensmittel- und Umweltanalytik anorganischer Spurenbestandteile*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994.
- Rood, D.: *Practical Guide to the Care, Maintenance and Troubleshooting of Capillary GC Systems*. Heidelberg: Hüthig-Verlag.
- Rotsche, H.: *Stationary Phases in Gas Chromatography*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1991.
- Schomburg, G.: *Gas Chromatography – A Practical Course*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft mbH, 1990.
- Schomburg, G.: *Gaschromatographie – Grundlagen, Praxis, Kapillartechnik*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft mbH, 1987.

К главе 4:

- Aced, G. und H.-J. Möckel: *Liquidchromatographie*. Apparative, theoretische und methodische Grundlagen der HPLC. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1991.
- Ardrey, R. E.: *LC-MS: An Introduction*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994.
- Bristow, P. A.: *Liquid Chromatography in Practice*. Macclesfield, U. K.: DCD (Pharmaceuticals Division), 1976.
- Engelhardt, H.: *High Performance Liquid Chromatography*. New York: Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 1979.
- Glöckner, G.: *Gradient HPLC and Chromatographie Cross-Fractionation*. Berlin: Springer Verlag, 1991.



- Gottwald, W.: *RP-HPLC für Anwender*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1993.
- Kirkland, J. J. und L. R. Snyder: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. New York: John Wiley & Sons, 1974.
- Molnar, L.: *Practical Aspects of Modern HPLC*. Berlin, New York: Walter de Gruyter Verlag, 1983.
- Scott, R. P. W.: *Liquid Chromatography Column Theory*. Chichester: John Wiley & Sons, 1992.
- Simpson, C. F.: *Practical High Performance Liquid Chromatography*. London: Heyden & Son Ltd. 1978.
- Subramanian, G.: *A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994.
- Subramanian, G.: *Process Scale Liquid Chromatography*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1995.
- Szepesi, G.: *How to Use Reverse-Phase HPLC*. Weinheim: VCH, 1992.
- Unger, K. K.: *Handbuch der HPLC*. Teil 1: Leitfaden für Anfänger und Praktiker. Teil 2: Präparative Säulenflüssig-Chromatographie. Darmstadt: GIT Verlag, 1989.

К главе 6:

- Gjerde, D. T. und J. S. Fritz: *Ion Chromatography*. Heidelberg, New York: A. Huethig Verlag, 1987.
- Weiss, J.: *Ion Chromatography*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1995.

К главе 7:

- Foret, F., L. Krivankova und P. bocek: *Capillary Zone Electrophoresis*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1993.
- Guzman, A.: *Capillary Electrophoresis*. New York: Marcel Dekker, 1993.
- Jandik, P. und G. Bonn: *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1993.
- Kuhn, R. und S. Hoffstetter-Kuhn: *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Berlin: Springer-Verlag, 1993.
- Li, S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis – Principles, Practice and Application*. J. Chromatogr. Library Vol. 52. Amsterdam: Elsevier-Verlag, 1992.
- Luque de Castro, M. D., M. Valcarcel und M. T. Tena: *Analytical Supercritical Fluid Extraction*. Berlin: Springer-Verlag, 1994.
- Vindevoegel, J. und P. Sandra: *Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography*. Heidelberg: Hüthig-Verlag, 1992.
- Wagner, H. und E. Blasius: *Praxis der elektrophoretischen Trennmethoden*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1989.
- Weinberger, R.: *Practical Capillary Electrophoresis*. London: Academic Press, 1993.
- Würzburger Kolloquium – *Kapillarelektrophorese – Chromatographie – Fortschrittsbericht '92*. Darmstadt: GIT Verlag GmbH, 1992.

К главе 8:

- Saito, M., Y. Yamauchi und T. Okuyama: *Fractionation by Packed-Columns SFC and SFE – Principles and Application*. New York: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994.
- Smith, R. M.: *Supercritical Fluid Chromatography*. RSC Chromatography Monographs. London: Royal Chemical Society, 1988.
- Wenclawiak, B. W.: *Analysis with Supercritical Fluids: Extraction and Chromatography*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1992.

К главе 9:

- Adams, H. W.: *Integriertes Managementsystem für Sicherheit und Umweltschutz*. München: Carl Hanser Verlag, 1995.
- AQS – *Analytische Qualitätssicherung*. Rahmenempfehlung der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) für Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen. Herausgegeben von der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser. Berlin: Erich Schmidt Verlag, 1989.
- Bank, M.: *Basiswissen Umwelttechnik*. Würzburg: Vogel Buchverlag, 1994.
- Beck, M.: *Ökobilanzierung*. Würzburg: Vogel Buchverlag, 1993.
- Beck, M.: *Umweltrecht*. Würzburg: Vogel Buchverlag, 1993.
- Beier, E.: *Umweltlexikon für Ingenieure und Techniker*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994.
- Briefert, C.: *Umweltchemie*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994.
- Christ, G. A., S. J. Harston und H. W. Hembeck: *GLP-Handbuch für Praktiker*. Darmstadt: GIT Verlag, 1992.
- Döttlinger, K., U. Lutz und K. Roth: *Betriebliches Umweltmanagement*. Springer-Verlag, Berlin 1995.
- Fellenberg, G.: *Chemie der Umweltbelastung*. Stuttgart, Leipzig: B. G. Teubner GmbH, 1992.
- Funk, W., V. Dammann und G. Donnevert: *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1992.
- Günzler, H.: *Akkreditierung und Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1994.
- Hein, H. und W. Kunze: *Umweltanalytik mit Spektrometrie und Chromatographie*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994.
- Kamiske, G. F.: *Umweltmanagement – Moderne Methoden und Techniken zur Umsetzung*. München: Carl Hanser Verlag, 1995.
- Kromidas, S.: *Qualität im analytischen Labor*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994.
- Kummer, H.-J.: *Umweltinformationsgesetz*. Handbuch für die betriebliche Praxis. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1995.
- Matter, L.: *Lebensmittel- und Umweltanalytik mit der Kapillar-GC*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994.
- Nakagawa, A. S.: *LIMS: Implementation and Management*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994.
- Neitzel, V. und K. Middeke: *Praktische Qualitätssicherung in der Analytik*. Ein Leitfaden. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1994.
- Neitzel, V.: *Labordatenverarbeitung mit Labor-Informations- und Management-Systemen (LIMS)*. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1992.
- Söhngen, K.: *Qualitätssicherungs-Handbuch im Labor*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong: Springer-Verlag, 1995.
- Taschenbuch «Entsorgung '95»*, herausgegeben vom Bundesverband der Deutschen Entsorgungswirtschaft (BDE). Bonn: Friedhelm Merz Verlag, 1995.
- Turner, G. R.: *Total Quality Management in the Chemical Industry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994.
- Wille, F.: *Bodensanierungsverfahren*. Würzburg: Vogel Buchverlag, 1993.

Список сокращений

ААС	Атомно-абсорбционная спектроскопия
АЭД	Атомно-эмиссионный детектор
АМЭ	Автоматизированная многократная элюция
АФД	Азотно-фосфорный детектор
АЦП	Аналого-цифровой преобразователь
ВДПЖХ	Планарная жидкостная хроматография высокого давления
ВТГХ	Высокотемпературная газовая хроматография
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭКЭ	Высокоэффективный капиллярный электрофорез
ВЭТСХ	Высокоэффективная тонкослойная хроматография
ВЭТТ	Высота эквивалентная теоретической тарелке
ВРМС	Масс-спектрометрия высокого разрешения
ГФХ	Гель-фильтрационная хроматография
ГХ	Газовая хроматография
ГХВР	Газовый хроматограф высокого разрешения
ДДС	Додецилсульфат натрия
ДИГ	Детектор ионизации гелия
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОИК-Фурье	Диффузная отражательная инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье
ДЭЗ	Детектор электронного захвата
ДЭП	Детектор электролитической проводимости
ДТП	Детектор теплопроводности
ЖХ	Жидкостная хроматография
ЖХНД	Жидкостная хроматография низкого давления
ИК-Фурье	Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье
ИПТ	Испарение с программируемой температурой
ИСП	Индукционно-связанная плазма
ИТФ	Изотахорофорез
ИХ	Ионная хроматография
ИЮПАК	Международный союз теоретической и прикладной химии
КГЭ	Капиллярный гель-электрофорез
КЖХ	Колоночная жидкостная хроматография
КЗЭ	Капиллярный зонный электрофорез
КИТФ	Капиллярный изотахофорез
КИЭФ	Капиллярная изоэлектрофокусировка
ККМ	Критическая концентрация мицеллообразования
КСКФХ	Капиллярная сверхкритическая флюидная хроматография
КЭ	Капиллярный электрофорез
МАХА	Международная Ассоциация химиков-аналитиков
МС	Масс-спектрометрия
МСД	Масс-селективный детектор
МЭКХ	Мицеллярная электрокинетическая хроматография

ОАЭС	Оптическая атомно-эмиссионная спектроскопия
ОДС	Октадецилсилан
ОКК	Открытые капиллярные колонки (WCOT)
ОКК-ТН	Открытые капиллярные колонки с твердым носителем (SCOT)
ОКК-ТС	Открытые капиллярные колонки с тонким слоем
ОФ	Обращенная фаза
ОЭС	Оптическая эмиссионная спектроскопия
ПАВ	Поверхностно-активное вещество
ПАУ	Полициклические ароматические углеводороды
ПДК	Предельно допустимая концентрация
ПИД	Пламенно-ионизационный детектор
ПИМ	Плазма, индуцированная микроволнами
ПИТ	Полный ионный ток
ПК	Персональный компьютер
ПМЭ	Программируемая многократная элюция
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
ПЭФ	Полиэферы
ПФД	Плазменно-фотометрический детектор
ПХБ	Полихлорбензолы
РМД	Рефрактометрический детектор
РХД	Редокс-хемилюминесцентный детектор
СКФХ	Сверхкритическая флюидная хроматография
СКФЭ	Сверхкритическая флюидная экстракция
ТСХ	Тонкослойная хроматография
ТФЭ	Твердофазная экстракция
ТФМЭ	Твердофазная микроэкстракция
ФИД	Фотоионизационный детектор
ФЭУ	Фотоэлектронный умножитель
УФ/Вид	Ультрафиолетовая/Видимая область спектра
ХИ	Химическая ионизация
ЦД	Циклодекстрины
ЭДТУ	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭОП	Электроосмотический поток
ЭУ	Электронным ударом ионизация
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс

Английские аббревиатуры

GLP	Good Laboratory Practice Хорошая лабораторная практика
SIMS	Chromatographie Informations-Managementsysteme Система управления хроматографической информацией
TVO	Закон о питьевой воде
LIMS	Laboratory Information Management Systems Система управления информацией в лаборатории