

С. ПЕРРИ
Р. АМОС
П. БРЮЕР

ПРАКТИЧЕСКОЕ
РУКОВОДСТВО
ПО ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ



PRACTICAL LIQUID CHROMATOGRAPHY

S.G. Perry, R. Amos, and P.I. Brewer

Esso Petroleum Company, Limited

Esso Research Centre

Abingdon, Berkshire, England

Plenum Press, New York-London, 1972

С. Перри, Р. Амос, П. Брюер

**ПРАКТИЧЕСКОЕ
РУКОВОДСТВО
ПО
ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ**

Перевод с английского
канд. хим. наук О.Г. ЛАРИОНОВА

Под редакцией
чл.-корр. АН СССР К.В. ЧМУТОВА

ИЗДАТЕЛЬСТВО "МИР" МОСКВА 1974

Книга является практическим руководством по подготовке и проведению анализов методами жидкостной колоночной хроматографии и хроматографии в тонких слоях. Она продолжает серию, в которую вошли такие книги, как "Введение в газовую хроматографию" Мак-Нейра и Бонелли ("Мир", 1970), "Количественная хроматография на бумаге и в тонком слое" Шелларда ("Мир", 1971), "Основы жидкостной хроматографии" Хадден и др. ("Мир", 1973).

Изложение материала в книге имеет целью предоставить читателю возможность рационально подойти к выбранной конкретной системе и облегчить подбор оптимальных условий для разделения смеси веществ, что особенно важно для работника, не обладающего практическими навыками, для правильной постановки хроматографического эксперимента.

Книга предназначена для инженерно-технических и научных работников, применяющих метод жидкостной хроматографии в повседневной практике.

Редакция литературы по химии

С Перевод на русский язык, «Мир», 1974.

П $\frac{0254-87}{041(01)-74}$ 087-74

ПРЕДИСЛОВИЕ

Предисловия к книгам по жидкостной хроматографии в настоящее время обычно начинают с сравнения этого метода с газовой хроматографией. При всех несомненных достоинствах, к числу которых относится и отличная оснащенность аппаратурой, и быстрота проведения анализа, газовый метод имеет и некоторые недостатки. Прежде всего, исследованию могут быть подвергнуты смеси веществ, обладающих заметной упругостью пара при выбранной достаточно высокой температуре, а многие вещества в этих условиях подвергаются деструкции. Правда, разделение можно констатировать и по продуктам деструкции, но тем не менее этот недостаток весьма существен.

Метод жидкостной хроматографии, который в обычном колоночном оформлении считался медленным, имеет свои преимущества, а именно возможность работы с конденсированными фазами при высоких температурах, что очень важно при биохимических исследованиях. Ускорение анализа достигается использованием колонок малого сечения и применением высоких давлений и высокодисперсных сорбентов. Жидкостная хроматография стала успешно конкурировать с другими разновидностями метода.

Особые надежды авторы этой книги возлагают на суперкритическую жидкостную хроматографию, где некоторые вещества (двуокись углерода, *n*-пентан, изопропанол, диэтиловый эфир) выше своей критической точки под давлением могут применяться в качестве подвижной фазы. Развитие этого метода сулит большие перспективы в хроматографии органических веществ.

Название книги достаточно точно соответствует ее содержанию. Здесь детально описываются практические приемы подготовки и проведения исследований в области жидкостной хроматографии в колонках и хроматографии в тонких слоях, причем под словом "подготовка" следует понимать не только обеспечение эксперимента необходимыми материалами и оборудованием. Описание каждого вида колоночной хроматографии предшествует краткое теоретическое введение. Задача такого введения – дать физическую картину описываемого явления и процесса, установить связь между различными параметрами. Изложение этого материала имеет целью помочь читателю ра-

ционально подойти к выбранной конкретной системе и облегчить выбор оптимальных условий для разделения смеси веществ. Такое построение, несомненно, принесет пользу читателю, имеющему достаточную подготовку в области физической и коллоидной химии, но не обладающему практическими навыками для правильной постановки хроматографического эксперимента.

Подобная книга неизбежно носит "компилятивный" характер, но это отнюдь не упрек авторам. Подбор и манера изложения материала сделаны мастерски. Книга, безусловно, будет с интересом встречена научными работниками, аспирантами, студентами и всеми, кто творчески работает в этой области аналитической химии.

К. Чмутов

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРОВ

Данная книга является введением в практическую высокоскоростную и высокоэффективную жидкостную хроматографию. В ней рассматриваются и сравниваются хорошо известный метод хроматографии в тонком слое и современный вариант хроматографии в колонке, который приобрел важное значение в последние пять лет.

Процесс развития жидкостной хроматографии проходил неравномерно в соответствии с уровнем развития ряда других научных дисциплин; сейчас жидкостная хроматография играет важную роль в самых разных исследованиях. Например, ионообменная хроматография тесно связана с разделением редких земель, ситовая хроматография — с фракционированием природных соединений, белков и синтетических полимеров. Распределительная хроматография, особенно в виде хроматографии на бумаге, представляет собой ценный метод изучения биохимических систем, а ее более современный аналог — хроматография в тонком слое — развивалась наиболее быстро в области фармакогнозии и фармацевтики. До недавнего времени жидкостная хроматография, однако, не играла заметной роли в области промышленного органического анализа. В опубликованных монографиях и статьях главным образом рассматриваются теоретические основы жидкостной хроматографии, и ни одна из этих книг не может служить практическим руководством для аналитиков-органиков, занятых в промышленности.

Пытаясь восполнить этот пробел, мы и написали данную книгу. В ней не приводятся никаких новых теорий; используя теоретические представления других авторов, мы попытались ответить на вопросы, возникающие при проведении эффективных разделений органических веществ в органических средах. Ориентируясь в первую очередь на аналитиков-практиков, мы обсуждаем механизм адсорбционной распределительной и ситовой хроматографии и, основываясь главным образом на собственном опыте, рассматриваем технику хроматографии в тонком слое и современной хроматографии в колонке. Надеемся, что книга поможет химикам-органикам решать проблемы разделения и будет способствовать дальнейшему развитию высокоэффективной жидкостной хроматографии, которая, несомненно, будет играть такую же

важную роль, какую в настоящее время играет газовая хроматография.

Число ссылок в книге сокращено до минимума. Однако, используя приведенную литературу, читатель может познакомиться с наиболее важными из имеющихся публикаций. Любой полный список литературы в результате быстрого развития современной хроматографии в колонке неизбежно быстро устареет. Заранее просим извинить за любое упущение.

Нам хотелось бы поблагодарить профессора Кейлеманса — автора первой широко известной монографии по газовой хроматографии, которая, несомненно, стимулировала развитие работ в этой области, за любезное согласие написать предисловие. Хотелось бы надеяться, что наши усилия не были напрасными и что эта книга в свою очередь хоть в какой-то степени ускорит развитие жидкостной хроматографии.

*С. Перри
Р. Амос
П. Брюер*

ПРЕДИСЛОВИЕ К АМЕРИКАНСКОМУ ИЗДАНИЮ

Датская пословица "Goede wijn behoeft geen krans" гласит: "Хорошее вино не нуждается в рекомендации"; тем не менее я с большим удовольствием согласился написать предисловие к книге доктора С. Перри, Р. Амоса и П. Брюера. Доктор С. Перри принадлежит к числу наиболее молодых участников этапа бурного развития газовой хроматографии, в то же время он играет ведущую роль в современном возрождении жидкостной хроматографии. Большой заслугой Р. Амоса является популяризация хроматографии в тонком слое как метода анализа нефтяных продуктов, а П. Брюер – автор одной из первых статей по использованию ситовой хроматографии для разделения синтетических полимеров. Авторы не избегают теории, но, работая в промышленной лаборатории, они прежде всего практики. Старое и молодое поколения хроматографистов хорошо знают авторов не только по их публикациям, но и по многочисленным личным контактам. Я имел удовольствие работать с доктором Перри в нашей университетской лаборатории, когда он в течение года стажировался там после защиты докторской диссертации, и поэтому имел возможность узнать и оценить его выдающиеся способности и трезвость взглядов. Настоящая книга ясно показывает это. Теория в ней рассматривается только там, где это необходимо. Большие потенциальные возможности и ограничения хроматографических методов, объединенных под общим названием "жидкостная хроматография", трактуются самым объективным образом.

Монография представляет собой весьма необходимое практическое руководство для тех, кто работает или будет работать в перспективной области жидкостной хроматографии. Следует обратить внимание на характер библиографии данной книги. Возможности, открываемые компьютерами, сейчас значительно облегчают создание полных библиографий, но в этой монографии авторы провели критический отбор литературы. Книга не нуждается в рекомендации для того, чтобы стать настольным пособием хроматографистов-практиков, и данное предисловие – лишь открытое подтверждение искренней дружбы между прошлым и будущим, между двумя поколениями хроматографистов-энтузиастов.

А. Кейлеманс

1.1. ВВЕДЕНИЕ

Жидкостная хроматография была известна еще в прошлом столетии /1/, но только в последние 10 лет она начала необычайно быстро развиваться и стала общепризнанным методом разделения и анализа органических веществ. До 1958 г. хроматографирование проводилось при использовании сравнительно больших образцов обычно в коротких колонках большого диаметра. Проявляющая жидкость протекала через колонки под действием силы тяжести. Хроматография в тонком слое была известна только небольшой группе исследователей /2/, хотя хроматография на бумаге в это время уже широко использовалась.

Начиная с 1958 г. хроматография в тонком слое стала самым простым, дешевым и одним из наиболее эффективных методов, пригодных для разделения малолетучих компонентов органических смесей. Этот метод широко используется многими лабораториями при проведении научных исследований, а также для качественного контроля промышленных процессов органического синтеза. Позднее техника хроматографирования в колонке была радикально переосмыслена, и теперь этот метод мало отличается по легкости, эффективности и скорости разделения от газовой хроматографии.

В данной книге мы попытались описать современное состояние теории и практики жидкостной хроматографии применительно к анализу смесей органических веществ. Основное внимание направлено на практические аспекты хроматографии, а необходимые элементы теории включены с тем, чтобы дать читателю возможность оценить обоснованность практических рекомендаций.

1.2. ПЛАН КНИГИ

Жидкостная хроматография в настоящее время быстро развивается, поэтому мы постарались сконцентрировать внимание только на тех вопросах, которые особенно интересны аналитикам-органикам, работающим в промышленности, и попытались изложить основы техники жидкостной хроматографии таким образом, чтобы книга длительное время не устаревала.

В первой главе книги мы рассмотрим различные типы жидкостной хроматографии и приведем определения или объясним некоторые из наиболее важных терминов.

В гл. 2 дается соответствующая трактовка динамических процессов, происходящих в слое неподвижной фазы, через которую протекает жидкость. В конечном счете эти процессы определяют возможную степень разделения, так как они вызывают размывание полосы во всех хроматографических процессах. В этой же главе кратко рассматриваются теории, позволяющие установить связь между параметрами процесса и размыванием полосы, и приводятся практические рекомендации.

В трех последующих главах обсуждаются принципы основных видов жидкостной хроматографии (адсорбционной, распределительной и ситовой), объясняется механизм селективности и приводятся примеры достигаемого разделения в отдельных рассматриваемых системах, подробно говорится об используемых материалах (особенно неподвижных фазах), причем, как всегда, основное внимание уделяется практическим вопросам.

В гл. 6 и 7 рассматриваются аппаратура и методика хроматографии в тонком слое и в колонке.

В последней короткой главе авторы старались дать общую картину современного состояния жидкостной хроматографии.

Поскольку данная книга задумана как практическое руководство, мы ограничились сравнительно небольшим числом цитируемых ссылок. Такого же принципа мы придерживались и при составлении списка дополнительной литературы. Как правило, в книге не приводятся исторические даты и выводы теоретических уравнений, поскольку эти вопросы очень подробно рассмотрены в литературе, а также почти нет ссылок на частные случаи хроматографического разделения. Сведения такого рода дадут информационная служба*, журналы** и книги /1, 3/.

Короче говоря, мы попытались ответить на вопросы – что, почему и как, – касающиеся методики и материалов, используемых в современной жидкостной хроматографии; хроматография на бумаге и ионообменная хроматография здесь не рассматриваются.

* "The Journal of Chromatography" регулярно публикует библиографию, охватывающие работы по хроматографии в тонком слое и в колонках.

** Статьи по жидкостной хроматографии и ее применению регулярно публикуются в следующих журналах: "Analytical Chemistry", "The Analyst", "The Journal of Chromatographic Science", "The Journal of Chromatography".

1.3. ОСНОВНЫЕ ВИДЫ ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматография является процессом, с помощью которого разделяют молекулы различных типов. Образец смеси вводят в слой неподвижной фазы, и вместе с подвижной фазой компоненты образца перемещаются вдоль слоя со скоростью, зависящей от величины взаимодействий компонентов с неподвижной и подвижной фазами. Различие в величинах этих взаимодействий приводит к разности в скоростях движения компонентов через слой неподвижной фазы, в результате достигается их разделение.

Если подвижная фаза – жидкость, то процесс называется жидкостной хроматографией, именно этот вид хроматографии и рассматривается в настоящей книге. В качестве подвижной фазы используются также газы (газовая хроматография) и вещества, находящиеся при температуре выше критической (сверхкритическая хроматография).

Подвижную фазу, вводимую в слой неподвижной фазы, часто называют элюентом, а элюент плюс растворенные вещества, покидающие неподвижный слой, – элюатом.

Неподвижная фаза обеспечивает разделение молекул, если она обладает хотя бы одним из четырех приведенных ниже основных свойств: 1) физически сорбирует растворенные вещества из раствора; 2) химически сорбирует растворенные вещества из раствора; 3) растворяет разделяемые вещества в несмешивающемся растворителе при контакте с растворами; 4) имеет пористую структуру и поэтому удерживает одни растворенные вещества и не задерживает другие в зависимости от их размера или формы.

Каждое из этих свойств используется в одном из широко известных вариантов жидкостной хроматографии, которые в общих чертах будут рассмотрены ниже.

1.3.1. Адсорбционная хроматография*

В адсорбционной хроматографии в первую очередь используется различие в относительном сродстве соединений к твердому адсорбенту, взятому в качестве неподвижной фазы. Сродство почти полностью определяется полярными взаимодействиями**. Это означает, что полярные группы в молекулах, подлежащих разделению, влияют на процесс разделения намного сильнее, чем неполярные углеводородные цепи. Поэтому в адсорбционной хроматографии анализируемые смеси,

*Мы считаем целесообразным пользоваться терминами "адсорбционная", "распределительная" и "ситовая" хроматография, так как они лучше всего характеризуют виды хроматографии по механизму процессов, лежащих в их основе. – *Прим. перев.*

** Это справедливо только для полярных адсорбентов. – *Прим. перев.*

как правило, делят на классы, характеризующиеся числом и типом полярных групп.

1.3.2. Ионообменная хроматография

В ионообменной хроматографии используется различное сродство ионов раствора к ионообменным центрам противоположной полярности в неподвижной фазе. Этот метод применим главным образом к средам с высокой диэлектрической проницаемостью, в которых ионные частицы стабильны. Разделение методом ионообменной хроматографии выполняется преимущественно в водных средах, и поэтому данный метод применяют главным образом в неорганической химии. Некоторые разделения проводят в смешанных растворителях /6/ Однако в данной книге обсуждаются только такие случаи применения ионообменных неподвижных фаз, когда ионообменные материалы эффективно действуют как адсорбенты, обладающие специфичным функциональным сродством.

1.3.3. Распределительная хроматография

В распределительной хроматографии используется различная относительная растворимость (или, точнее, распределение) веществ между подвижной фазой и жидкой фазой (растворитель), удерживаемой неподвижно на пористом инертном носителе. Обычно неподвижная фаза более полярна, чем подвижная. В некоторых случаях однако, удобнее, чтобы неподвижная фаза была менее полярна. Этот метод известен как распределительная хроматография с обращенной фазой.

В принципе распределительная хроматография дает широкий выбор эффектов, обеспечивающих селективность, поскольку можно изменять природу двух жидких фаз, но в действительности, как мы увидим, выбор жидких фаз ограничен. На разделение значительное влияние оказывает соотношение полярных и неполярных групп в растворенных веществах и двух жидких фазах. Следовательно, таким методом можно разделить вещества по типам соединений или по длинам цепей.

1.3.4. Ситовая хроматография

В ситовой хроматографии, которая известна также как гелефильтрационная, гелепроницающая, или молекулярно-ситовая, используется способность материалов с контролируемой пористостью сортировать и разделять компоненты смеси в соответствии с размером и формой их молекул. Ситовая хроматография развивалась по двум параллельным направлениям, удивительно мало влиявшим друг на друга. Одно направление – применение гидрофильных полимеров, та-

ких, как сшитые декстраны, для разделения биологических материалов главным образом в водных средах. Другое направление — использование синтетических материалов, полимеров или неорганических пористых веществ для разделения промышленных органических веществ, в частности пластмасс и полимеров. Такие разделения почти всегда выполняются в органических растворителях, и в данной книге им будет уделено основное внимание.

На практике можно объединять вышеназванные механизмы. Так в адсорбционной хроматографии адсорбция может быть физической, обусловленной, например, диполь-дипольными взаимодействиями, или химической, вызванной ионным обменом или образованием комплексов. Кроме того, часть подвижной фазы, особенно если она содержит воду или некоторые другие полярные растворители, может сорбироваться твердым телом и образовывать неподвижную жидкую фазу, в которой могут распределяться растворенные вещества.

1.4. МЕТОДЫ ПРОЯВЛЕНИЯ ХРОМАТОГРАММ

Процесс переноса растворенных веществ подвижной фазой через неподвижную называется проявлением.

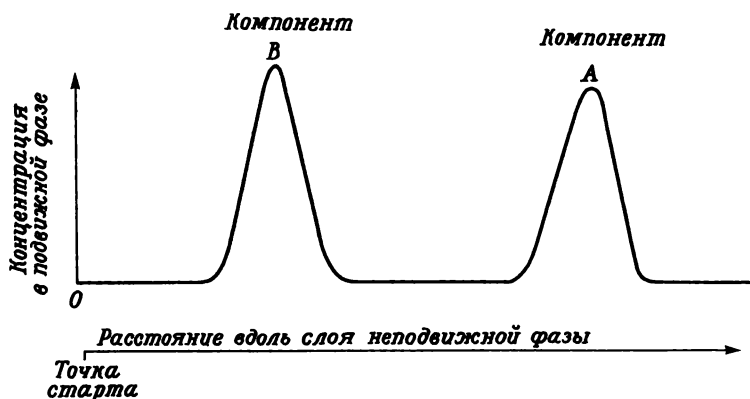
Не следует путать проявление с опрыскиванием тонкослойных хроматограмм реагентами, которые образуют окрашенные производные и таким образом раскрывают присутствие разделенных компонентов. Этот процесс часто также называют "проявлением" (окрашенных пятен), хотя его лучше называть обнаружением или выявлением.

Хроматограммы можно проявлять тремя различными методами: элюированием, фронтальным анализом и вытеснением. Наиболее широко, несомненно, используется элюирование. Фронтальный анализ фактически никогда не применяют в аналитической химии. Методы вытеснения применяются нечасто, но этот принцип используется, например, в очень важном и широко распространенном методе анализа углеводов, стандартизированном Американским обществом по испытанию материалов и Институтом нефти.

1.4.1. Элюирование

Рассмотрим поведение смеси растворенных веществ А и В, размешенных первоначально на одном конце слоя неподвижной фазы. Предположим, что В удерживается слоем сильнее, чем А. Если через слой пропускать подвижную фазу, которая удерживается слабее, чем А и В, то эта фаза будет вымывать вещества А и В со скоростями, соответствующими степени их удерживания. При достаточно большом различии в скоростях перемещения первоначально наложенные друг на друга зоны А и В будут постепенно разделяться и в итоге образуют две обособленные зоны, разделенные чистым элюентом. При-

чем зона А будет продвигаться впереди зоны В. Если изотермы сорбции линейны (см. гл. 3), график распределения концентраций растворенных веществ вдоль слоя будет аналогичен показанному на рис. 1.1, причем профиль концентраций для каждого вещества будет иметь вид гауссовой кривой.



Р и с. 1.1. Элюирование бинарной смеси.

1.4.2. Фронтальный анализ

В этом случае смесь непрерывно подают в начало слоя неподвижной фазы и заставляют ее продвигаться к другому концу слоя. Если В удерживается сильнее, чем А, фронт растворенных веществ будет обедняться компонентом В и в конечном счете на другом конце слоя появится чистый компонент А. Тем временем произойдет насыщение слоя компонентом В, и он начнет продвигаться вдоль слоя вместе с компонентом А. В итоге через слой будет протекать смесь исходного состава. Таким образом, с помощью этого метода разделения можно выделить только пробу чистого компонента А.

1.4.3. Вытеснение

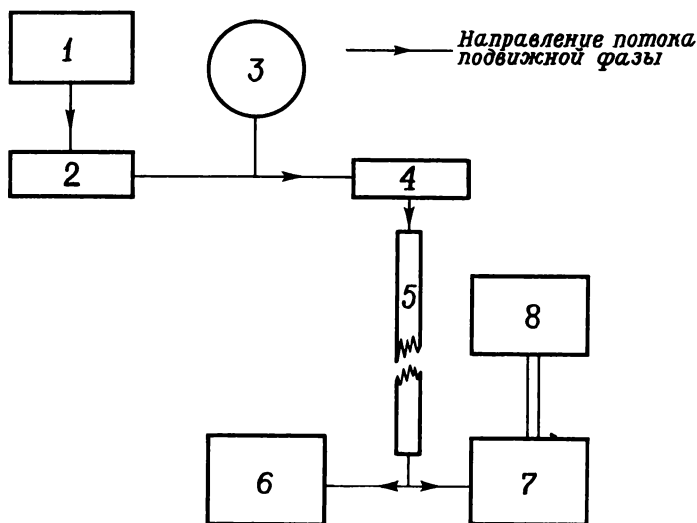
Как и при элюировании, небольшую пробу помещают на одном конце слоя неподвижной фазы. Но подаваемая подвижная фаза на этот раз удерживается сильнее веществ А и В, поэтому она вытесняет и проталкивает эти компоненты по всему слою. Так как В удерживается сильнее, чем А, то А движется перед В. Существуют также

промежуточные зоны, составы которых меняются от чистого А до чистого В и от чистого В до чистой подвижной фазы. Таким образом, в отличие от фронтального анализа с помощью этого метода часть компонентов может быть получена в чистом виде.

1.5. АППАРАТУРНЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ХРОМАТОГРАММ

Неподвижную фазу либо помещают в колонку, либо распределяют в виде тонкого открытого слоя. В последнем случае слой либо удерживается на стеклянной, металлической или пластмассовой подложке, как в хроматографии в тонком слое, либо сам является одновременно подложкой, как в хроматографии на бумаге. Ниже приведены основные методы проведения хроматографии в колонке и в тонком слое.

1.5.1. Хроматография в колонке



Р и с. 1.2. Схема колоночного хроматографа.

1 — резервуар с элюентом; 2 — насос или другой источник давления; 3 — манометр; 4 — устройство для ввода пробы; 5 — колонка; 6 — коллектор фракций; 7 — детектор; 8 — самописец с линейной диаграммой.

На рис. 1.2 показана схема типичного колоночного хроматографа. Неподвижной фазой заполняют стеклянную, пластмассовую или металлическую трубку, исследуемую пробу помещают в верхнюю часть заполненной трубки и через колонку из резервуара с элюентом про-

пускают подвижную фазу. Подвижная фаза движется под действием гидростатического давления; если же необходимо более высокое давление, то используют насос. Компоненты пробы выходят из колонки в виде разбавленного раствора в подвижной фазе, где их можно оп-ределить при помощи соответствующего детектора или собрать.

1.5.2. Хроматография в слое

Неподвижную фазу распределяют в виде тонкого слоя на подложке из стекла, пластмассы или металла. Пробу наносят около одного края слоя, который затем погружают в подвижную фазу. Растворитель проходит через неподвижную фазу под действием капиллярных сил (восходящая или горизонтальная хроматография) или под действием силы тяжести (нисходящая хроматография). Компоненты пробы мигрируют через слой, но хроматографический процесс обычно прекращают до того, как растворенные вещества достигнут внешнего края слоя. Разделенные зоны исследуют *in situ* или же удаляют для дальнейшего изучения.

1.6. КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ РАЗДЕЛЕНИЙ

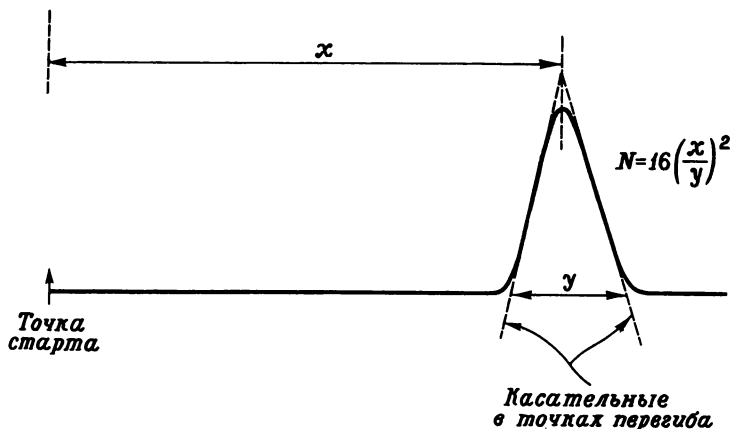
Количественный критерий степени разделения, достигаемой в хроматографическом процессе, необходим по меньшей мере по двум причинам. Во-первых, при наличии такого критерия экспериментатор может объективно оценивать влияние изменения различных рабочих параметров и выбрать такие, которые приводят к лучшим разделениям. Во-вторых, зная эффективность разделения в колонке или в тонком слое образца смеси известного состава, можно предполагать, какова будет эффективность разделения другого образца.

В качестве критерия степени разделения широко используются две величины: высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), и разделительная способность (R). Эти величины могут быть связаны такими свойствами систем, как коэффициенты распределения. Однако мы не будем рассматривать подобные соотношения и посоветуем читателю обратиться к нескольким превосходным руководствам, посвященным целиком этим вопросам (см. список дополнительной литературы в конце главы). Следует, однако, определить смысл двух вышеупомянутых терминов и привести способы расчета их величин.

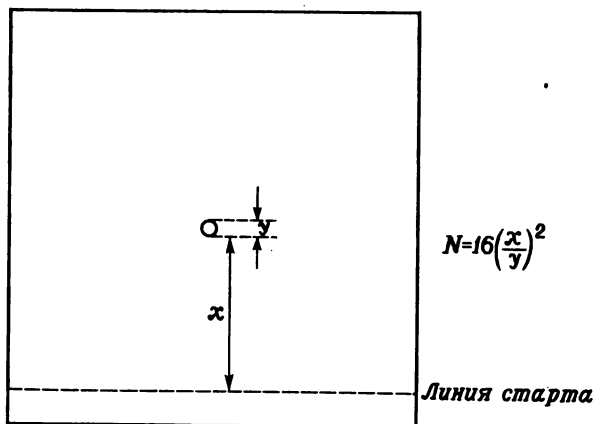
1.6.1. ВЭТТ

Этот термин, часто обозначаемый сокращенно H , лежит в основе количественных теорий хроматографии и широко используется в следующей главе. Он взят из теории ректификации, в которой теорети-

ческая тарелка соответствует такой части ректификационной колонки, в которой пар и жидкость находятся в равновесии. Длина, или высота, этой зоны и есть ВЭТТ. Мартин и Синдж развили теорию хроматографии, используя представления теории тарелок. Во всех более



Р и с. 1.3. Определение числа теоретических тарелок из элютивной хроматограммы.



Р и с. 1.4. Определение числа теоретических тарелок из хроматограммы в тонком слое.

поздних трактовках в качестве основной характеристики колонки или тонкого слоя также используется величина N . На рис. 1.3 представлена запись элютивной хроматограммы, зарегистрированной де-

тектором на выходе из колонки длиной L . Число теоретических тарелок N данной колонки можно вычислить по уравнению

$$N = 16 (x / \gamma)^2,$$

поэтому длина колонки, соответствующая одной тарелке (т.е. ВЭТТ), определяется уравнением $H = L/N$. Следует отметить, что существует несколько других методов вычисления N . Приведенный здесь метод применяется наиболее часто, и для расчета N достаточно самых простых измерений. Заметим, что N в данном выражении является по существу функцией частного от деления величины удерживания растворенного вещества на ширину его пика. Хроматограмма в тонком слое показана на рис. 1.4, здесь также

$$N = 16 (x / \gamma)^2,$$

однако в этом случае $L = x$ и поэтому $H = \gamma^2 / 16x$.

1.6.2. Разделительная способность

ВЭТТ является суммарной характеристикой разделения, но ее величина зависит от времени удерживания разделяемого вещества. Однако в связи с тем, что при сравнении различных колонок их разделительная способность не увеличивается с возрастанием ВЭТТ, пользоваться этой характеристикой неудобно. Поэтому, чтобы эффективность разделения можно было сравнивать, лучше пользоваться критерием, непосредственно характеризующим способность системы разделить два компонента. Наиболее подходящим для этого параметром является разделительная способность. Эта величина все чаще используется в качестве критерия, с помощью которого в стандартизованных методах оцениваются газохроматографические колонки. Несомненно, в будущем он будет играть такую же роль в жидкостной хроматографии. Следует отметить, что разделительная способность в отличие от ВЭТТ зависит как от селективности (разделение максимумов двух соседних пиков), так и от факторов, характеризующих качество выполнения разделения (ширина пика).

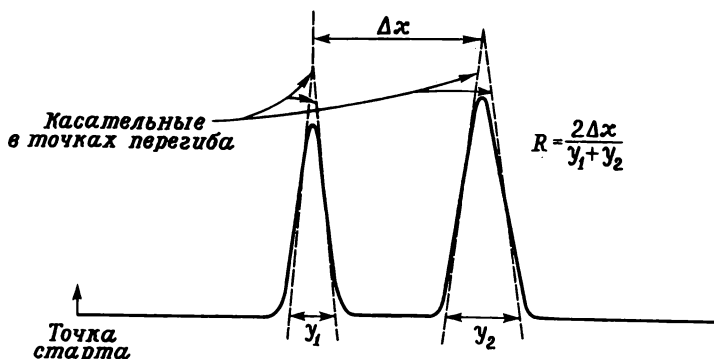
Для приведенной на рис. 1.5 элютивной хроматограммы двух компонентов разделительная способность R дается уравнением

$$R = 2(\Delta x) / (\gamma_1 + \gamma_2).$$

Определенную таким способом величину R можно образно рассматривать как максимальное число дополнительно разделенных компонентов, которые могут быть размещены между двумя указанными компонентами.

1.7. ПАРАМЕТРЫ УДЕРЖИВАНИЯ

В данной хроматографической системе время и объем подвижной фазы, необходимые для элюирования рассматриваемого вещества из слоя неподвижной фазы, постоянны. Следовательно, время или объем, требуемые для элюирования данного вещества, также постоянны по



Р и с. 1.5. Определение разделительной способности в элютивной хроматографии.

сравнению с временем или объемом, необходимыми для элюирования другого конкретного вещества. Это позволяет рассматривать понятие "удерживание" с двух позиций: 1) различные методы описания удерживания и их соотношение; 2) использование удерживания для идентификации растворенных веществ.

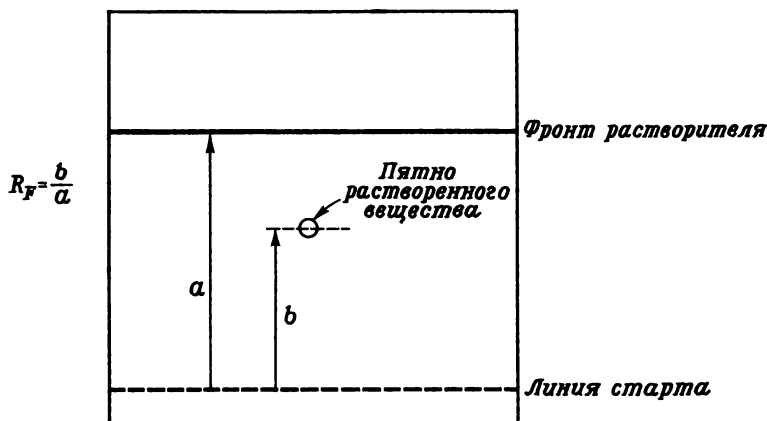
1.7.1. Критерии удерживания

Объем удерживания растворенного вещества V_r — это объем подвижной фазы, необходимый для элюирования данного вещества через слой неподвижной фазы. "Мертвый объем" V_0 слоя неподвижной фазы равен объему подвижной фазы, содержащемуся в слое при насыщении. Коэффициент разделения растворенного вещества K выражается отношением концентрации вещества в неподвижной фазе к концентрации вещества в подвижной фазе в равновесных условиях. Это отношение известно также как коэффициент распределения. Величины связаны выражением

$$V_r = V_0 + K V_s, \quad (1.1)$$

где V_s — объем неподвижной фазы в слое.

Очевидно, что для данной системы удерживание вещества может быть выражено в абсолютных (как объем элюента, необходимый для его элюирования), приведенных (как объем элюента, необходимый для элюирования вещества, приходящийся на грамм неподвижной фазы) и относительных величинах (как отношение, скажем, абсолютных объемов удерживания растворенного вещества и вещества, выбранного для сравнения).



Р и с. 1.6. Определение величины R_F в хроматографии в тонком слое.

Для характеристики поведения растворенных веществ в жидкостной хроматографии широко используются как абсолютный объем удерживания, так и относительные величины. Другим параметром удерживания, используемым особенно часто в хроматографии в плоских слоях (т.е. на бумаге или в тонком слое), является величина R_F — отношение расстояния, которое растворенное вещество прошло за заданное время, к расстоянию, пройденному подвижной фазой. На рис. 1.6 показано, как измеряется величина R_F растворенного вещества в хроматографии в тонком слое.

1.7.2. Удерживание и идентификация

Выражение (1.1) ясно показывает, что в фиксированной системе V_r (и, следовательно, R_F) постоянен для данного растворенного вещества. Поэтому V_r может быть приравнен к другим физическим константам этого вещества и использован для идентификации последнего. Таким образом, хотя хроматография прежде всего представля-

ет собой метод разделения, используя характеристики удерживания, можно идентифицировать разделенные компоненты сложного образца. Такого рода идентификацию можно подтвердить, выделив элюированное вещество и получив, например, его масс- или ИК-спектр. Использование для идентификации данных химического анализа и спектральных данных является обычным потому, что некоторые растворенные вещества могут иметь в выбранной системе одинаковые значения V_r (или R_F) или эти величины не могут быть определены с известными веществами.

Удерживание растворенных веществ, как, безусловно, и их коэффициент разделения, или распределения, связано с их химической структурой. Например, в жидкостной распределительной хроматографии удерживание i -го члена гомологического ряда дается уравнением

$$\log V_{r,i} = m N_i, \quad (1.2)$$

где m — константа, N_i — число атомов углерода в гомологе. Следовательно, зная поведение других членов гомологического ряда, можно предсказывать удерживание.

В ряде случаев можно также использовать то обстоятельство, что введение данной функциональной группы в молекулу ведет к определенному изменению V_r , т.е. соответствует определенному ΔV_r . Воспользовавшись табулированными значениями ΔV_r , полученными для различных функциональных групп в одной или двух хроматографических системах, можно определить химическую природу "неизвестного соединения".

Таким образом, основная мысль, приведенная в предшествовавших разделах, заключается в том, что удерживание является характерным свойством растворенного вещества и систематически изменяется с изменением структуры.

Список литературы

1. *Heftmann E.* (ed.), *Chromatography*, Reinhold, New York, 1967.
2. *Pelick N., Bolliger H.R., Mangold H.K.*, *Advan. Chromatog.*, **3**, 85 (1966).
3. *Stahl E.* (ed.), *Thin Layer Chromatography*, Springer-Verlag, Berlin, 1969.
4. *Webster P.V., Wilson J.N., Franks M.C.*, *J. Inst. Pet.*, **56**, 50 (1970).

Список дополнительной литературы

Квалифицированные обзоры различных аспектов жидкостной хроматографии можно найти в двух периодических изданиях:
Chromatographic Reviews, Lederer M. (ed.), Elsevier, Amsterdam.
Advances in Chromatography, Giddings J.C., Keller R.A. (eds), Marcel Dekker, New York.

Глава 2

РАЗМЫВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ЗОН

2.1. ВВЕДЕНИЕ

Бегло ознакомившись с практикой хроматографии, в ней можно увидеть скорее искусство, чем науку. Несомненно, накопленный опыт часто определяет основное направление при постановке эксперимента. Теоретические соображения, даже элементарные, лишь в редких случаях играют главную роль при разработке и проведении хроматографического разделения. В жидкостной хроматографии это положение выражено более отчетливо, чем в газовой. В самом деле, несмотря на семидесяти – восьмидесятилетнюю историю, в жидкостной хроматографии до середины 60-х годов почти не наблюдалось прогресса. Материалы и оборудование, используемые для большинства адсорбционных работ, проводимых в колонках, в настоящее время все еще мало отличаются от тех, которыми пользовались Дей и Цвет.

Мы решили написать эту книгу, чтобы показать читателю, что практические проблемы разделения можно решить более успешно, используя существующую теорию хроматографии и выпускаемые в настоящее время новые материалы (такие, как пористые полимеры, носители с контролируемой поверхностной пористостью, ионообменные смолы) с хорошо определенными химическими и физическими свойствами.

В этой главе будут рассмотрены основные процессы, протекающие при элюировании растворенных веществ жидкостями через слои твердых частиц.

Экспериментальные факты, лежащие в основе современных знаний в этой области, получены в многочисленных исследованиях, выполненных в газовой хроматографии с газовыми подвижными фазами. Большая информация получена также в результате исследования химико-технологических процессов на слоях адсорбентов и катализаторов, а также при геохимическом изучении структур нефтяных полей. В последние годы были проведены основные исследования в области жидкостной хроматографии. В результате было подтверждено, что заключения, полученные на основе упомянутых выше исследований, справедливы и для жидкостной хроматографии.

Целью проведения хроматографического эксперимента является разделение двух данных веществ или всех компонентов сложной сме-

си. В аналитической химии разделение должно быть достаточным для того, чтобы компоненты можно было различить и измерить. Если же необходимо получить более или менее чистую фракцию или индивидуальное вещество для дальнейшей работы, то необходимо осуществить препаративное разделение, т.е. по существу полное разделение веществ в количествах несколько больших, чем это требуется для успешной аналитической хроматографии. Имеются два пути достижения хроматографического разделения. Первый, который будет детально рассмотрен в последующих главах, может быть назван селективным. В этом случае две несмешивающиеся фазы стараются выбрать таким образом, чтобы компоненты, подлежащие разделению, имели достаточно различные удерживания. Благодаря этому можно сравнительно легко достичь разделения.

Второй путь заключается в способе выполнения разделения. При тщательном приготовлении слоя неподвижной фазы и проведении операции элюирования можно разделять материалы даже с крайне незначительными различиями в коэффициентах распределения. На практике обычно объединяют оба пути. Приведенные на рис. 2.1 диаграммы иллюстрируют возможные пути разделения.

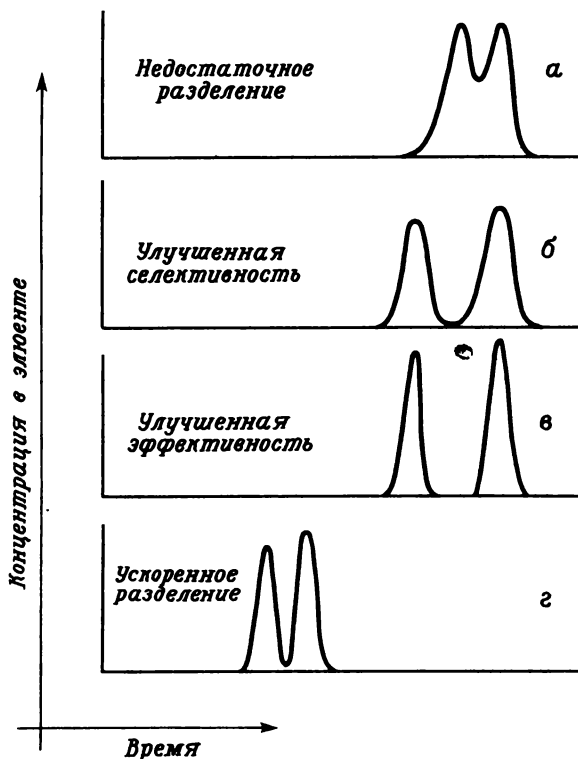
На рис. 2.1, *а* хроматографическая система не может обеспечить достаточное разделение. При изменении условий, например замене неподвижной фазы на более селективную, достигается хорошее разделение за то же время (рис. 2.1, *б*). Используя те же фазы, но работая с более совершенными приборами и тщательно проводя операции, получают более острые пики и, следовательно, лучшее разделение за то же самое время (рис. 2.1, *в*). При тщательном выборе прибора и условий проведения процесса можно получить такое же хорошее разделение, как на рис. 2.1, *б*, за более короткое время (рис. 2.1, *г*).

2.2. ФАКТОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ РАЗМЫВАНИЕ ЗОН

Проба растворенного вещества, введенная в верхнюю часть заполненной хроматографической колонки, занимает конечную длину колонки, образуя зону. При прохождении через колонку зона становится более диффузной (рис. 2.2). Этот эффект размывания полосы всегда имеет место и, конечно, снижает разделяющую способность. Чем больше степень размывания полос двух соседних компонентов в хроматографической системе, тем труднее их разделить. Поэтому важно знать, каким образом конструкция системы, ее геометрия, свойства неподвижной фазы, а также условия проведения процесса влияют на размывание полосы. Далее мы рассмотрим эти эффекты на количественной основе и сделаем выводы, которые дадут нам возможность планировать и осуществлять хроматографические разделения с необходимой разделяющей способностью. За последние

три десятилетия мы стали значительно лучше понимать хроматографический процесс. История развития концепции размывания зоны рассмотрена Гиддингсом, в работах которого в настоящее время дается наиболее глубокое описание хроматографических процессов /1/.

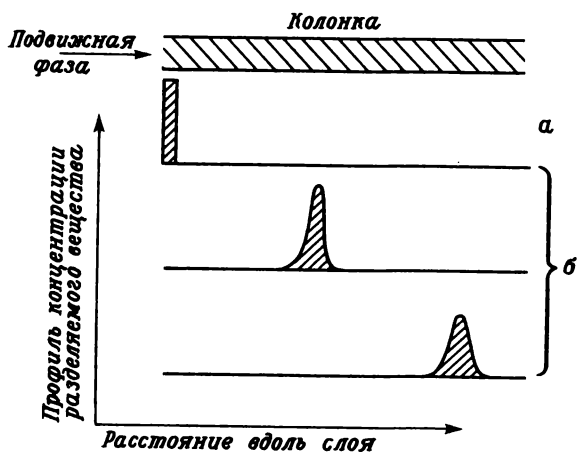
Вероятно, самой первой вехой на этом пути была статья Вильсона /2/, которая привлекла внимание к влиянию скорости подвижной фазы. Вильсон отметил, что передний край полосы растворенно-



Р и с. 2.1. Оптимизация разделения.

го вещества из-за низкой скорости адсорбции мигрировал через слой адсорбента со скоростью большей, а задний край из-за низкой скорости десорбции – со скоростью меньшей, чем основная часть растворенного вещества. Отрицательное влияние низких скоростей массопередачи между неподвижной и подвижной фазами можно уменьшить

путем снижения скорости потока подвижной фазы, но при более низких скоростях потока становятся заметнее нежелательные эффекты диффузии. Таким образом, к 1940 г. стали известны три важные особенности метода хроматографии: 1) влияние на размывание полюсы скорости массопередачи между фазами, 2) эффект диффузии, 3) поскольку влияние скорости потока на массопередачу и диффузию противоположно, должна существовать оптимальная скорость подвижной фазы. Вскоре после работы Вильсона была опубликована класси-



Р и с. 2.2. Размывание полосы вещества при прохождении через слой неподвижной фазы.

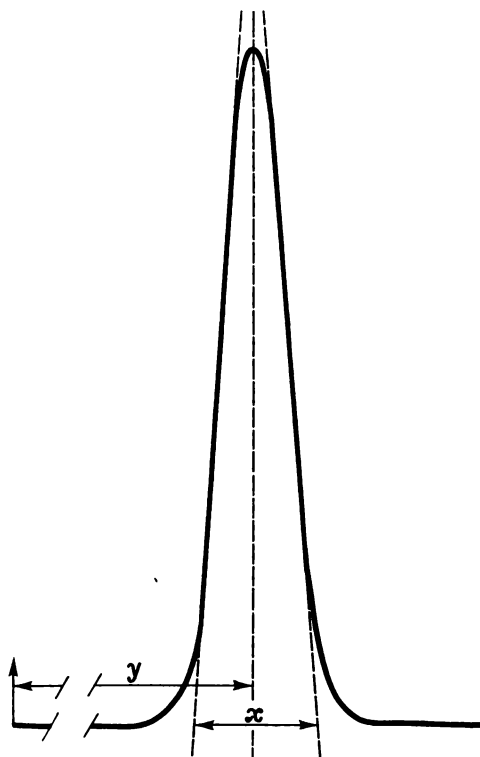
а — острый профиль введенного вещества; *б* — постепенно размывающийся профиль.

ческая статья Мартина и Синджа [3], в которой была разработана "тарелочная теория" хроматографии. Согласно этой теории, хроматографическая колонка представляется состоящей из ряда слоев, в каждом из которых существует равновесное распределение вещества между неподвижной и подвижной фазами. Такие слои были названы "теоретическими тарелками", а их высота H и есть "высота, эквивалентная теоретической тарелке" (ВЭТТ). Предполагая (следует заметить, что это допущение может быть ошибочным), что равновесие между фазами не зависит от концентрации, а диффузионные эффекты отсутствуют, можно получить математическую картину продвижения полосы растворенного вещества через колонку, из которой следует, что элюированная полоса имеет форму и ширину кривой нормального распределения ошибок (рис. 2.3).

ВЭТТ колонки можно вычислить из выражения

$$H = Lx^2 / 16y^2,$$

где L — длина колонки, а x и y имеют значения, показанные на рис. 2.3.



Р и с. 2.3. Форма хроматографической полосы.

Тарелочная теория позволяет оценить характеристики колонки, но она не дает какого-либо объяснения действительному поведению вещества в колонке. Как и Вильсон, Мартин и Синдж установили, что скорость подвижной фазы должна быть оптимальной, и пришли к выводу, что ВЭТТ зависит от квадрата диаметра частиц слоя. Кроме того, они установили, что значительное влияние на размывание полос оказывает диффузия растворенного вещества, непостоянство коэффициентов распределения при повышенных концентрациях и снижение эффективности разделения из-за неравномерности потока, проходящего через колонку. Таким образом, к началу 40-х годов по крайней мере качественно были определены основные факторы, влияющие на хроматографический процесс. В последующие два десятилетия эти положения были детально развиты, что

привело к появлению теории "случайного шага" и общей неравновесной теории Гиддингса.

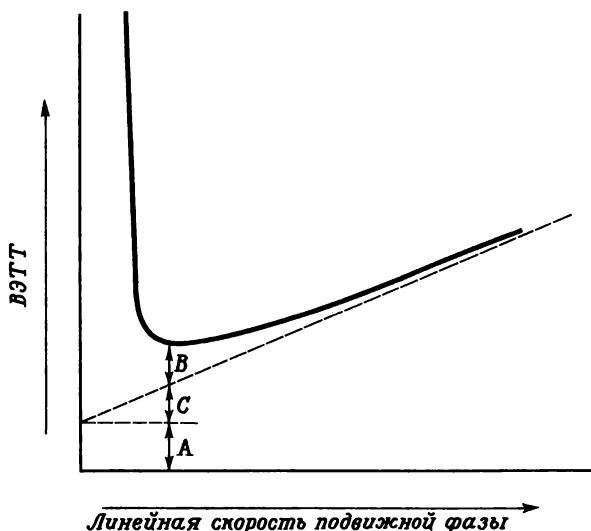
Прежде чем перейти к рассмотрению этих теорий, следует проанализировать выражение, известное в газовой хроматографии как уравнение ван Деемтера, также являющееся важной вехой в развитии теории хроматографии. Это уравнение было развито ван Деемтером и др. /4/ для того, чтобы связать ВЭТТ со скоростью потока,

в нем учитываются массопередача, продольная диффузия и неоднородность потока.

Уравнение ван Деемтера может быть записано как

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{\nu} + \frac{8}{\Pi^2} \left[\frac{k'}{(1+k')^2} \right] \frac{d_f^2 \nu}{D_s}, \quad (2.1)$$

где λ – безразмерный параметр, связанный с нерегулярностью набивки; d_p – средний диаметр частиц; γ – параметр, так же как λ , связанный с изменениями потока; D_m – коэффициент молекулярной диффузии растворенного вещества в подвижной фазе; ν – средняя скорость подвижной фазы; k' – коэффициент распределения (т.е. количество растворенного вещества в неподвижной фазе, деленное на количество в подвижной фазе в любой момент времени); d_f – толщина неподвижной жидкой пленки; D_s – коэффициент молекулярной



Р и с. 2.4. Зависимость высоты тарелки от скорости подвижной фазы.

диффузии растворенного вещества в неподвижной фазе. Уравнение (2.1) часто упрощают:

$$H = A + (B/\nu) + C\nu, \quad (2.2)$$

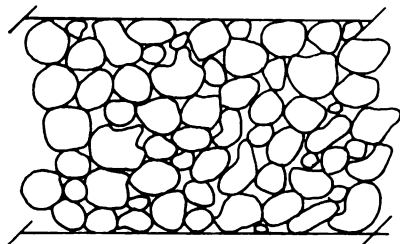
и тогда эта зависимость имеет вид гиперболы, как показано на рис. 2.4. В газовой хроматографии это уравнение успешно использо-

валось и используется при разработке высокоэффективных колонок. При подстановке подходящих численных значений, например коэффициентов диффузии, уравнение можно использовать для конструирования и отработки режима эксплуатации высокоэффективных жидкостных хроматографических колонок.

Итак, как мы видели, имеется ряд теорий хроматографии, все они прямо или косвенно дают нам сведения о хроматографическом процессе. Мы привели основные положения наиболее важных теорий и с их помощью установили некоторые важные хроматографические параметры. Поскольку книга предназначена для практиков, которым необходимо решать конкретные аналитические задачи, мы постарались в этой главе дать ясную картину механизма процесса хроматографирования. Для объяснения механизма размывания зон в хроматографии целесообразно использовать фундаментальный и легко понятный подход Гиддингса. Обсуждение этих вопросов приводится в последующих разделах данной главы. Полную трактовку проблемы читатель найдет в отличной монографии Гиддингса /1/.

2.3. КОНЦЕПЦИЯ "СЛУЧАЙНОГО ШАГА"

В дальнейшем обсуждении мы будем использовать следующую модельную систему: неподвижная фаза помещена в трубку с большим отношением длины к диаметру, подвижная жидкая фаза протекает через нерегулярно упакованный слой, состоящий в основном из частиц неправильной формы (рис. 2.5). Скорость, с которой молекула проходит через колонку, в принципе определяется средством этой моле-



Р и с. 2.5. Увеличенное поперечное сечение заполненного слоя.

кулы к неподвижной фазе: чем оно больше, тем дольше молекула находится в неподвижном состоянии. Таким образом, разделение методом селективной жидкостной хроматографии предполагает использование двух фаз с максимально возможным различием в средстве к мо-

лекулам растворенных веществ. Далее этот вопрос обсуждается более подробно.

На эту среднюю скорость движения молекулы данного типа через колонку накладываются различные небольшие отклонения, вызванные конечной скоростью массопередачи вещества между фазами, диффузией его как в подвижную, так и в неподвижную фазы и различием в длинах путей потока через неподвижную фазу из-за нерегулярности упаковки слоя.

Об этих процессах мы уже говорили в связи с размыванием зоны, а теперь рассмотрим их с позиций концепции "случайного шага". На молекулярном уровне движение является беспорядочным. Облако дыма рассеивается в неподвижном воздухе во всех направлениях, тогда как при легком ветерке на рассеивание накладывается смещение ветром. Аналогично четкая "пробка" растворенного вещества в хроматографической колонке будет стремиться рассеяться под влиянием межмолекулярных столкновений и в результате примет гауссово распределение концентраций с центром в среднем положении "пробки".

При обсуждении следствий случайного характера массопередачи надо различать: 1) скорость, с которой молекулы перемешаются, находясь в подвижной фазе V_m ; 2) скорость, с которой они перемещаются, находясь в неподвижной фазе (она равна нулю), 3) среднюю скорость движения молекул в колонке V_{av} :

$$V_{av} = R_r V_m, \quad (2.3)$$

где R_r — коэффициент удерживания, т.е. доля молекул растворенного вещества в подвижной фазе в любой момент времени. Следовательно (и это очень важно), попавшая в неподвижную фазу молекула отстает от центра полосы, в то время как при десорбции в подвижную фазу она опережает его. Продвижение молекулы через колонку, видимо, является последовательностью случайных остановок и возобновления движения то впереди, то сзади центра полосы. Конечным результатом является симметричное рассеивание молекул данного вещества около среднего положения, причем степень рассеивания возрастает с увеличением числа таких остановок и стартов и с увеличением скорости подвижной фазы.

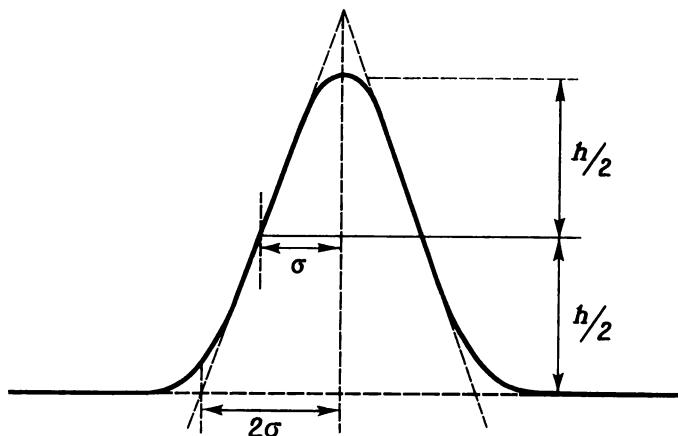
В фиксированном нерегулярно упакованном слое, состоящем из частиц неправильной формы, каналы, по которым движется поток подвижной фазы, более или менее неупорядоченны. В то время как одни каналы довольно широкие, другие могут быть сужены. В результате возможны весьма значительные локальные изменения в скорости подвижной фазы. Время, за которое различные молекулы растворенного вещества проходят действительные пути в подвижной фазе, будет различным. Это явление, также ведущее к рассеиванию мо-

лекул растворенного вещества около их среднего положения, часто называют "вихревой диффузией".

Таковы случайные процессы, происходящие в жидкостной хроматографии. Чтобы охарактеризовать эту качественную картину с помощью измеримых и контролируемых параметров, которые позволяли бы осуществлять хроматографические разделения настолько эффективно, насколько это возможно, мы применим некоторые простые методы статистики.

2.4. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КОНЦЕПЦИИ "СЛУЧАЙНОГО ШАГА"

Представим, что все молекулы растворенного вещества "выстроились" на одной линии в жидкой среде. Беспорядочное движение молекул приведет к тому, что они сделают различные по величине "шаги" в обе стороны от линии старта. Концентрационный профиль пос-



Р и с. 2.6. Профиль элюируемого пика.

ле n шагов средней длины l имеет вид гауссовой кривой (рис. 2.6), для которой стандартное отклонение дается выражением

$$\sigma = l \cdot n^{1/2} \quad (2.4)$$

(Квадратичная связь между σ и n отражает тот факт, что последовательные случайные шаги молекулы могут происходить как в одном и том же, так и в противоположном направлении. Последнее обстоятельство уменьшает среднее рассеивание.)

В ходе хроматографирования различные случайные процессы происходят одновременно; общая связь между средним стандартным отклонением σ и отклонениями отдельных процессов $\sigma_1, \sigma_2 \dots$ выражается соотношением

$$\sigma^2 = \sum_1^i \sigma_i^2. \quad (2.5)$$

Согласно другому важному соотношению, полученному из теории тарелок,

$$H = \sigma^2 / L, \quad (2.6)$$

где H – ВЭТТ, а L – длина колонки.

При обсуждении молекулярной диффузии полезно использовать уравнение Эйнштейна

$$\sigma^2 = 2Dt_D, \quad (2.7)$$

где D – коэффициент диффузии, t_D – общее время, в течение которого происходит диффузия.

Эти основные простые уравнения дают нам возможность получить количественные соотношения, описывающие размывание полосы, используя реальные физические свойства хроматографической системы. Далее поочередно рассматриваются количественные выражения для каждого из процессов: молекулярной диффузии, массопередачи и "вихревой" диффузии.

2.5. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИФФУЗИЯ

Мы рассматриваем диффузию растворенного вещества в направлении потока. Величины коэффициентов диффузии молекул растворенного вещества в жидкостях примерно на пять порядков меньше, чем в газах. В газовой хроматографии размывание полосы, вызываемое продольной молекулярной диффузией, фактически полностью обусловлено диффузией в подвижной фазе. В жидкостной хроматографии, где используются жидкие подвижные фазы, ситуация более сложна.

В распределительной, а также ситовой хроматографии наблюдается значительная диффузия как в неподвижной, так и в подвижной фазе. В адсорбционной хроматографии следует рассматривать диффузию в подвижной фазе и на поверхности. Гиддингс /5/ говорит о необходимости изучения диффузии на поверхностях. Он считает, что скорости поверхностной диффузии, вероятно, должны быть близки к скоростям диффузионных процессов в жидкостях. Вполне вероятно, хотя и не доказано, что энергия адсорбции и геометрия адсорбента определяют скорость поверхностной диффузии и, следовательно, влияют

на общее размывание полосы. Очевидно, чем сильнее адсорбируется растворенное вещество (т.е. чем выше его теплота адсорбции), тем меньше оно способно диффундировать вдоль поверхности. Поскольку для ряда веществ, имеющих различные теплоты адсорбции, время жизни в адсорбированном состоянии меняется приблизительно параллельно теплоте адсорбции, то разумно предположить, что общее размывание полосы, обусловленное поверхностной диффузией, для этих веществ примерно одинаково. Из-за отсутствия экспериментальных данных поверхностная диффузия будет исключена из дальнейшего рассмотрения.

Молекулы в жидкостях удерживаются вместе относительно сильными межмолекулярными силами, которые препятствуют диффузии молекул растворенного вещества. Длина "случайного шага" диффундирующей молекулы растворенного вещества в жидкости примерно равна одному молекулярному диаметру, в то время как в газе длина такого шага близка к средней длине свободного пробега, т.е. составляет примерно 100 молекулярных диаметров. Коэффициенты диффузии сравнительно небольших молекул растворенного вещества в растворителях, состоящих из таких же небольших молекул, обычно равны примерно $10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Действительное значение, конечно, зависит от величины взаимодействия растворенное вещество – растворитель и от температуры.

Рассмотрим обусловленное диффузией размывание полосы и оценим влияющие на него факторы.

Уравнение Эйнштейна (2.7) позволяет рассчитать размывание полосы, обусловленное диффузией. Поскольку $\sigma^2 = 2Dt_D$, время диффузии равно времени пребывания молекулы в соответствующей фазе. Рассмотрим диффузию в подвижной фазе в хроматографическом слое длиной L , средняя скорость движения подвижной фазы через который равна ν . В этом случае

$$t_D = t_m = L/\nu, \quad (2.8)$$

где t_m – время пребывания молекулы в подвижной фазе. Таким образом, $\sigma^2 = 2D_m L/\nu$, где D_m – коэффициент диффузии растворенного вещества в подвижной фазе. Согласно уравнению (2.6), $H = \sigma^2/L$, поэтому

$$H = 2D_m/\nu. \quad (2.9)$$

Однако в упакованных слоях расстояние, на которое молекула фактически диффундирует, ограничено из-за того, что слой состоит из отдельных частиц, и поэтому необходимо ввести поправочный множитель γ_m , часто называемый коэффициентом извилистости. Поэтому для диффузии растворенного вещества в подвижной фазе

$$H = 2\gamma_m D_m/\nu. \quad (2.10)$$

При распределении вещества между двумя жидкими фазами в неподвижной жидкой фазе происходит случайная диффузия растворенного вещества. Если при этом в любой момент времени доля молекул растворенного вещества в подвижной фазе равна R_r , то из уравнений (2.6) и (2.7) следует, что

$$H = 2\gamma_s D_s (1 - R_r) / R_r \nu, \quad (2.11)$$

так как $t_s = t_m(1 - R_r) / R_r$, а $t_m = 1/\nu$. Здесь γ_s - фактор извилистости в неподвижной фазе, D_s - коэффициент диффузии растворенного вещества в неподвижной фазе, а ν - средняя скорость подвижной фазы.

Уравнения (2.10) и (2.11) дают требуемую информацию о вкладе продольной молекулярной диффузии в размывание полосы соответственно в подвижной и неподвижной фазах. Рассмотрим их величины. Ранее мы отметили, что типичные значения D_m равны примерно $10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$. Замена подвижной фазы (т.е. "растворителя") может привести к изменению D_m на несколько порядков. Эмпирическое выражение Вилка и Чанга [6] показывает, что

$$D_m \propto TM^{1/2} / \eta, \quad (2.12)$$

где T - абсолютная температура, M - молекулярный вес растворителя, η - вязкость растворителя. В табл. 2.1 указаны вязкости некоторых типичных подвижных фаз, используемых в хроматографии, и для сравнения приведена вязкость глицерина.

Таблица 2.1

Подвижная фаза	Вязкость, сП (мН с/м ²)			
	Температура, °С			
	0	20	40	60
Диэтиловый эфир	0,29	0,23	0,20	0,17
n-Гексан	0,40	0,32	0,26	0,22
Метилацетат	0,48	0,38	0,31	-
Хлороформ	0,70	0,56	0,47	0,39
Метанол	0,81	0,59	0,45	0,35
Бензол	0,90	0,65	0,59	0,39
Четыреххлористый углерод	1,35	0,97	0,74	0,58
Изопропиловый спирт	4,56	2,37	1,33	0,80
Глицерин	4600	850	-	-

Для перечисленных подвижных фаз значения η^{-1} меняются при 20°C примерно на один порядок, в то время как M - только при-

мерно в полтора раза. Следовательно, вязкость оказывает доминирующее влияние на D_m , и поскольку величина H должна быть как можно меньше, то на первый взгляд может показаться, что следует использовать наиболее вязкие элюенты при самых низких практически возможных температурах. Однако обычно γ равно примерно 0,6 /7/, а ν при "высокоэффективной" работе составляет $1 \text{ мм} \cdot \text{с}^{-1}$. Таким образом, уравнение (2.10) показывает, что вклад диффузии в подвижной фазе в общую высоту тарелки равен примерно 10^{-3} см . По сравнению с типичными высотами теоретических тарелок в эффективных жидкостных колонках (т.е. примерно $10^{-1} - 5 \cdot 10^{-1} \text{ см}$) вклад диффузии невелик. Поэтому следует сделать вывод, что, оптимизируя выбор подвижной фазы с точки зрения диффузии в ней растворенного вещества, можно достичь очень немногого. Гораздо более важными являются другие факторы.

При рассмотрении диффузии в неподвижной фазе и обсуждении процессов распределения жидкость – жидкость диапазон вязкостей и молекулярных весов намного шире и их значения меняются от обычных величин до значений, соответствующих очень вязким полимерным материалам. Если предположить, что неподвижная фаза имеет молекулярный вес 10 000 и вязкость ее примерно равна 1000 сП, то очень приблизительно можно оценить, что диффузия в этом случае составляет только одну сотую диффузии в подвижной фазе. Таким образом, этот фактор ничтожно мало влияет на размывание полосы.

Несмотря на то что влияние растворителя на D_m может быть очень значительным, мы видели, что в случае типичных материалов диффузионный фактор может оказывать крайне малое влияние на характеристику колонки даже в самых лучших из существующих в настоящее время колонок. Влияние на D_m типа растворенного вещества еще меньше, чем эффект замены растворителя. Френкель /8/ отмечает, что D_m в воде изменяется от $2 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ для газов до $0,3 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ для сахара. Указанные растворенные вещества резко отличаются по своей химической природе, однако это вызывает изменение величины D_m только на один порядок, тогда как, взяв эфир и глицерин в качестве "предельных" образцов растворителей, мы для данного растворенного вещества изменяем D_m примерно на три порядка /см. данные табл. 2.1 и уравнение (2.12)/.

Из этого следует, что продольная молекулярная диффузия очень незначительно влияет на размывание полосы в жидкостной хроматографии даже в случае наиболее совершенной современной техники проведения процесса.

2.6. МАССОПЕРЕДАЧА

На молекулярном уровне прохождение полосы растворенного вещества через хроматографический слой включает ряд перемещений молекул из подвижной фазы в неподвижную и обратно. В адсорбцион-

ной хроматографии происходит случайная адсорбция или десорбция молекул с поверхности, а в распределительной хроматографии молекулы вещества диффундируют к поверхности неподвижной жидкости или возвращаются в подвижную фазу. В этих системах переход в подвижную фазу требует, чтобы молекулы вещества имели определенный минимум энергии. Обратный переход в неподвижную фазу является случайным процессом, зависящим от молекулярной энергетики и структуры потока, которые контролируют контакты между фазами.

Для удобства будем обозначать процесс перехода растворенного вещества в неподвижную фазу термином "адсорбция", а процесс, при котором вещество покидает неподвижную фазу, — "десорбция". Используя концепцию "случайного шага", мы замечаем, что "десорбционный" шаг отвечает движению вперед, а "адсорбционный" — движению назад по отношению к центру полосы. При прохождении полосы через слой длиной L общее число шагов, которое делает молекула, вдвое больше, чем общее число адсорбционных актов, так как адсорбция каждый раз сопровождается десорбцией. В среднем между десорбцией и повторной адсорбцией молекула находится в подвижной фазе в течение t_m . На протяжении этого времени она движется вперед со скоростью подвижной фазы ν . Таким образом, чтобы преодолеть полную длину слоя L , требуется n' десорбций, где

$$n' = L/\nu t_m. \quad (2.13)$$

Для двойного числа случайных шагов $n = 2n'$

$$n = 2L/\nu t_m. \quad (2.14)$$

Здесь следует вспомнить, что размывание хроматографических полос надо рассматривать в связи с движением центра полосы. Перемещение полосы составляет только долю R_r общего перемещения молекулы в подвижной фазе. Это означает, что за время t_m десорбированная молекула перемещается на νt_m , а центр полосы — на $R_r \nu t_m$. Таким образом, перемещение молекулы относительно центра полосы равно

$$l = (1 - R_r) \nu t_m, \quad (2.15)$$

что соответствует средней длине шага.

Мы знаем, что $H = \sigma^2/L$, где L — длина колонки, и что $\sigma^2 = l^2 n$ где l — средняя длина шага, а n — число шагов. Поэтому подстановка (2.14) и (2.15) в эти выражения и исключение σ дает

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{l^2 n}{L} = [(1 - R_r)^2/L] \nu^2 t_m^2 (2L/\nu t_m),$$

или

$$H = 2(1 - R_r)^2 \nu t_m. \quad (2.16)$$

Значению H можно также выразить как функцию среднего времени пребывания молекулы в неподвижной фазе t_s . Поскольку

$$R_r = t_m / (t_m + t_s),$$

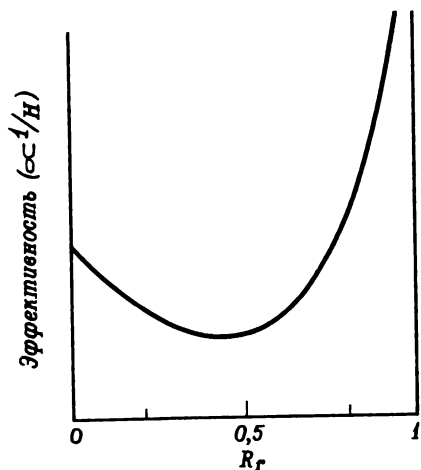
можно записать

$$R_r / (1 - R_r) = t_m / t_s \quad (2.17)$$

и, подставив опять в уравнение (2.16), получить соотношение

$$H = 2 R_r (1 - R_r) \nu t_s. \quad (2.18)$$

Соотношения (2.16) и (2.18) показывают, что высота тарелки возрастает линейно со скоростью подвижной фазы. Иными словами, размывание полосы, или расстояние, на которое молекула растворенного вещества отстает от центра полосы или опережает его, тем больше, чем больше скорость движения подвижной фазы. Уравнение (2.18) показывает, что между хроматографической эффективностью и удерживанием растворенного вещества существует взаимосвязь (рис. 2.7), причем эффективность сравнительно высокая для слабо удерживаемых материалов, проходит минимум для растворенных веществ, движущихся со скоростью, примерно равной половине скорости движения подвижной фазы, а затем при дальнейшем возрастании скорости опять увеличивается. При больших удерживаниях становятся заметными нежелательные последствия высоких значений t_s . Поэтому в качестве первого приближения можно принять, что наиболее высокие эффективности получаются в системах с низкой скоростью подвижной фазы и малым удерживанием. В распределительной хроматографии механизм обмена вещества между двумя фазами приближается к явлению адсорбции – десорбции, которое мы только что рассмотрели.



Р и с. 2.7. Соотношение между эффективностью и удерживанием.

заметными нежелательные последствия высоких значений t_s . Поэтому в качестве первого приближения можно принять, что наиболее высокие эффективности получаются в системах с низкой скоростью подвижной фазы и малым удерживанием. В распределительной хроматографии механизм обмена вещества между двумя фазами приближается к явлению адсорбции – десорбции, которое мы только что рассмотрели.

В любом случае для того, чтобы растворенное вещество сорбировалось и десорбировалось, необходимо определенное среднее время. Поэтому наиболее важны те факторы, которые влияют на эти процессы и определяют их скорость. В распределительной хроматографии основным является время диффузии t_D , необходимое для того, чтобы молекула прошла через пленку неподвижной жидкости толщиной d . Главным образом это время определяется величиной t_s . Из уравнения Эйнштейна следует, что $\sigma^2 = 2 D_s t_s$. Для каждого акта сорбции мы можем приравнять σ к d .

$$d^2 = 2 D_s t_s. \quad (2.19)$$

Полученное выражение можно подставить в общее уравнение массопередачи (2.18). В результате для распределительной хроматографии

$$H = R_r(1 - R_r)\nu d^2/D_s. \quad (2.20)$$

Здесь опять выполняется линейная зависимость H от скорости подвижной фазы. Кроме того, приведенная зависимость показывает, что лучшей эффективности (т.е. более низких значений H) можно достичь, диспергируя неподвижную жидкость таким образом, чтобы толщина ее пленки (или глубина лужиц) была как можно меньше. В первом приближении можно сказать, что для повышения эффективности в распределительной хроматографии следует использовать сравнительно малые количества неподвижных жидкостей с низкой вязкостью /уравнение (2.12)/.

Для типичного разделения методом ЖРХ

$$\begin{aligned} R_r(1 - R_r) &\simeq 0,25 \\ \nu &\simeq 0,1 \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}, \\ d^2 &\simeq 10^{-8} \text{ см}^2, \\ D_s &\simeq 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}. \end{aligned}$$

Соответственно из уравнения (2.20) следует, что вклад массопередачи в высоту тарелки в распределительной хроматографии составляет примерно $2,5 \cdot 10^{-5}$ см.

В адсорбционной хроматографии значения d , а также, возможно,

D_s отличаются от соответствующих величин в распределительных системах. "Глубина" неподвижной фазы d приближается к глубине пор в адсорбенте и неизбежно меняется в зависимости от методов приготовления адсорбента и размера частиц. В качестве грубого приближения мы можем приравнять d радиусу частицы. В этом случае в высокоэффективных системах d имеет порядок 10^{-3} см. Коэффициент диффузии в неподвижной фазе D_s — величина, оценить которую гораздо труднее. По-видимому, разумно предположить, что она несколько ниже, чем в неподвижных жидкостях, нанесенных на порис-

тые подложки. Поэтому, если исходить из значения D_s , типичного для распределительной хроматографии, для адсорбционной хроматографии можно принять $D_s = 5 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$. Поскольку $R_r(1-R_r)$ и ν в распределительной и адсорбционной хроматографии имеют одинаковые значения, то, подставляя соответствующие значения в уравнение (2.20), находим, что вклад массопередачи в величину высоты тарелки для адсорбционной хроматографии равен $5 \cdot 10^{-3} \text{ см}$. В ситовой хроматографии из-за уменьшения коэффициента диффузии с увеличением молекулярного веса размывание пика также увеличивается. Для небольших молекул размывание пика, обусловленное сопротивлением массопередаче, мало по сравнению с размыванием в результате вихревой диффузии, но для полимеров с высоким молекулярным весом этот эффект значителен.

Подставляя типичные значения $R_r(1-R_r) = 0,25$, $d^2 = 10^{-5} \text{ см}^2$ и $\nu = 0,1 \text{ см}^2 \text{ с}^{-1}$ в уравнение (2.20), получаем

$$H \approx 10^{-7} / D_s.$$

В табл. 2.2 приведены значения H , вычисленные из этого уравнения для различных веществ.

Следует отметить, что рассмотренный эффект, по-видимому, невелик и им можно пренебречь несмотря на то, что коэффициенты диффузии в неподвижной фазе уменьшаются в результате затруднений, вызванных сетчатой структурой геля.

Таким образом, вклад массопередачи в величину ВЭТТ в распределительной хроматографии очень мал ($\sim 10^{-5} \text{ см}$), в адсорбционной хроматографии он несколько выше ($\sim 10^{-3} \text{ см}$), а в ситовой хроматографии макромолекул становится доминирующим ($\sim 10^{-1} \text{ см}$).

Таблица 2.2

Вклад массопередачи в величину ВЭТТ в ситовой хроматографии

Вещество	D_s в толуоле [9], $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$	H , см
n-Гексан	$1,955 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-3}$
n-Гексатриаконтан	$7,03 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-3}$
Полистирол: мол. вес 10 300	$1,82 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-2}$
мол. вес 97 200	$5,13 \cdot 10^{-7}$	0,3

2.7. ВИХРЕВАЯ ДИФФУЗИЯ

Поток жидкости, проходящий через слой зернового сорбента, нерегулярен; жидкость протекает через множество различных взаимосвязанных каналов, отличающихся по извилистости и степени сужения. В результате пути, по которым движется поток жидкой фазы, имеют различную длину. По этой причине и вследствие локальных измене-

ний скорости потока время прохождения колонки различными молекулами значительно отличается от средней величины, а это может вызывать размывание полосы.

Так называемая классическая теория вихревой диффузии рассматривает только модель течения потока в упакованном слое. Гиддингс указал, что необходимо учитывать и возможное диффузионное движение вещества от одного пути потока к другому. Согласно Гиддингсу, скорость потока может изменяться под влиянием следующих пяти факторов:

1. "Канальный" эффект. В каналах, по которым движется поток, наибольшие скорости потока наблюдаются вдоль осей каналов, наименьшие – вблизи стенок.

2. "Межчастичный" эффект. В адсорбционной хроматографии поры преимущественно заполнены подвижной фазой. В распределительной хроматографии часть пор твердого носителя, не заполненная неподвижной фазой, также занята молекулами подвижной фазы. И в том и в другом случае эта часть подвижной фазы будет в основном неподвижна, но ее окружает движущаяся жидкость.

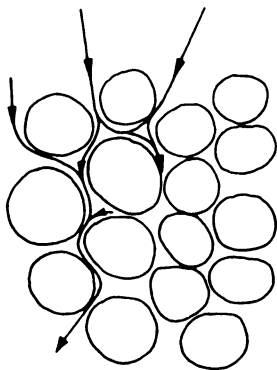
3. Эффект "смежных каналов". В смежных открытых и суженных каналах скорости потоков значительно отличаются.

4. Эффект "отдаленных каналов". Уже отмеченный выше эффект "смежных каналов" становится еще более значительным для больших зон упакованного слоя: средние скорости в смежных зонах (в отличие от смежных потоков) заметно отличаются.

5. "Колоночный эффект". В колонке или слое больших размеров скорость потока у стенки может быть на 10% больше, а в центре на 10% меньше средней скорости. Изгибание или скручивание колонки в кольца может вызвать дополнительную неоднородность потока.

Хотя эти эффекты почти не изучены экспериментально, очевидно, что регулярность набивки, размера частиц и их формы способствует уменьшению различий в скоростях потока подвижной фазы. Таким образом, вихревая диффузия полностью определяется свойствами неподвижной фазы. Следствием вихревой диффузии является размывание зон вещества, элюируемого через слой с помощью подвижной фазы. Некоторые молекулы вещества попадают в потоки, скорость которых больше, другие – в потоки, скорость которых меньше, чем средняя скорость. Вследствие этого молекулы вещества опережают центр полосы или отстают от него. Кроме того, каждая молекула может также переходить из одного потока в другой. Скорость нового потока, образовавшегося при слиянии двух путей, в весьма малой степени зависит от скоростей исходных потоков. Помимо того, молекула растворенного вещества может диффундировать из одного потока в другой. По этим причинам движущаяся через слой неподвижной фазы молекула то быстро перемешается, то медленно блуждает.

Применяя к этим процессам подход "случайного шага", мы можем в уравнении (2.7) принять, что σ равна d , где d — расстояние, на которое молекула диффундирует за время t_e , необходимое молекуле для того, чтобы перейти от одного режима скорости к другому. Расстояние d будет меняться в зависимости от того, какой из пяти перечисленных выше факторов изменения скорости потока управляет процессом. Поэтому в общем случае мы будем приравнивать d к $W_a d_p$, где величина W_a зависит от механизма процесса, а d_p — диаметр частицы. Величина d_p используется потому, что изменения в скоростях потока происходят в основном в пространстве между каждой парой смежных частиц, так как там, как пока-



Р и с. 2.8. Пути потока в слое шихты.

зано на рис. 2.8, происходит объединение нескольких потоков. При этом следует помнить, однако, что это двумерное представление является лишь слабым отражением действительной ситуации.

Таким образом, преобразовав уравнение (2.7), мы получим следующее выражение:

$$t_e = W_a^2 d_p^2 / 2D_m. \quad (2.21)$$

Длина шага случайного блуждания l равна расстоянию, на которое молекула опережает среднее положение (между переходами от одного пути к другому) или отстает от него. Это расстояние равно $\Delta u \cdot t_e$, где Δu — разность между действительной и средней скоростью, некоторая часть W средней скорости u (т.е. $\Delta u = u W$). Если мы запишем, что $u t_e = S$, где S — расстояние, в пределах которого молекула движется с более или менее постоянной скоростью, то

$$l = \Delta u t_e = W u t_e, \quad l = W S. \quad (2.22)$$

Если в сумме молекула мигрирует на расстояние L , то число шагов n дается выражением $n = L/S$, а поскольку $l^2 n = \sigma^2$ и $H = \sigma^2/l$, то

$$H = W^2 S, \quad (2.23)$$

а так как $S = ut_e$ и $t_e = W_a^2 d_p^2 / 2D_m$ /уравнение (2.21)/, следовательно,

$$H = W^2 W_a^2 d_p^2 u / 2D_m. \quad (2.24)$$

Следует помнить, что W_a зависит от типа пути потока. Поэтому мы объединим W и W_a в один член W_i , зависящий от пути потока, и перепишем (2.24) как

$$H = W_i^2 d_p^2 u / 2D_m. \quad (2.25)$$

Подставляя типичные значения d_p , u и D_m (10^{-3} см, 10^{-1} см·с $^{-1}$ и 10^{-5} см 2 ·с $^{-1}$ соответственно) в уравнение (2.25), находим, что порядок величины вклада вихревой диффузии в высоту тарелки равен 10^{-2} см.

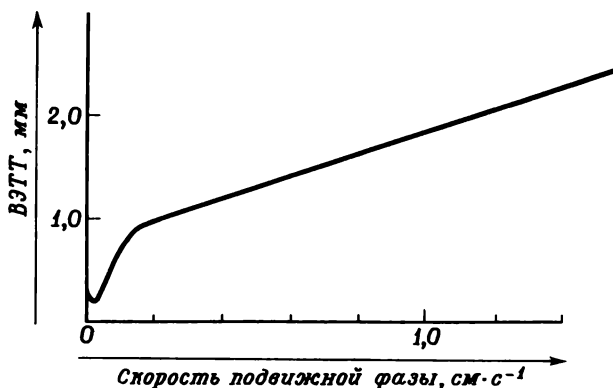
2.8. ОКОНЧАТЕЛЬНОЕ ВРАЖЕНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫСОТЫ ТАРЕЛКИ

Теперь мы можем собрать вместе различные вклады в общую величину высоты тарелки в хроматографической системе, т.е. вклады молекулярной диффузии в подвижной и неподвижной фазах /уравнения (2.10) и (2.11)/, вклад массопередачи /уравнения (2.18) и (2.20)/ и вклад вихревой диффузии /уравнение (2.25)/. Эти уравнения показывают, что основным фактором, определяющим высоту тарелки, является, по-видимому, скорость перемещения подвижной фазы, и окончательное выражение может быть записано следующим образом:

$$H = (B/u) + Cu + Au, \quad (2.26)$$

где A , B и C — коэффициенты, физический смысл которых мы объяснили выше. В этом уравнении суммируется влияние происходящих в хроматографическом слое процессов на форму (и, в частности, ширину) полосы элюируемого вещества. График уравнения имеет вид, показанный на рис. 2.4, на нем видны примерные вклады отдельных членов. В газовой хроматографии график такого типа достаточно хорошо известен. Для любой колонки можно легко установить соотношение между различными частями уравнения. Минимальная высота тарелки наблюдается при оптимальной скорости подвижной фазы. Тщательные исследования, выполненные для газохроматографических колонок с набивками, показали, что оптимальная скорость соответствует объемной скорости 1–50 мл·мин $^{-1}$, т.е. линейной скорости потока около 5 см·с $^{-1}$. При этих условиях разделение обычно длится 5–60 мин. Выше, рассматривая влияние различных факторов на высоту

тарелки в жидкостной хроматографии, мы отмечали, что по сравнению с газовой хроматографией здесь наблюдаются значительные отличия в величинах эффектов. В результате оптимальные скорости подвижной фазы в жидкостной хроматографии на несколько порядков ниже.



Р и с. 2.9. Экспериментальная кривая зависимости ВЭТТ от скорости подвижной фазы для эффективной колонки [10].

На рис. 2.9 показана кривая зависимости H — u для жидкостной адсорбционной хроматографической колонки [10]. Минимальное значение H наблюдается при линейной скорости примерно $0,02 \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$, которая эквивалентна объемной скорости потока $0,1 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$. При оптимальной или близкой к ней скорости подвижной фазы разделение на данной колонке обычно длится часами. Поскольку в случае адсорбционной или распределительной хроматографии вклад массопередачи в H невелик, то повышение скорости не сопровождается сколько-нибудь значительным увеличением H . Таким образом, на практике анализ может быть значительно ускорен без существенного снижения эффективности колонки.

Подводя итог, отметим, что вклады различных процессов, размывающих полосу, в величину высоты тарелки в жидкостной хроматографии имеют следующий порядок величин:

Молекулярная диффузия в подвижной фазе	$\sim 10^{-3} \text{ см}$
Молекулярная диффузия в неподвижной жидкой фазе	$\sim 10^{-5} \text{ см}$
Массопередача:	
при распределении	$\sim 10^{-5} \text{ см}$
при адсорбции	10^{-3} см
при ситовом эффекте	10^{-1} см
Вихревая диффузия	10^{-2} см

Несмотря на значительные упрощения, сделанные при таком анализе, ясно, что член, учитывающий диффузию во всех видах, вносит главный вклад в размывание полосы, а поскольку он пропорционален квадрату среднего диаметра частицы, то желательно использовать очень мелкие частицы. Улучшение регулярности упаковки, например в результате использования более симметричных частиц или более совершенной техники набивки, может еще больше уменьшить величину H . Именно поэтому в настоящее время столько усилий затрачивается на улучшение характеристик колонок путем приготовления носителей с заданными свойствами или адсорбентов, частицы которых имеют размеры вплоть до субмикронных.

2.9. ВНЕКОЛОНОЧНЫЕ ВКЛАДЫ В РАЗМЫВАНИЕ ПОЛОСЫ

До сих пор мы говорили о процессах, происходящих в слое неподвижной фазы при элюировании через нее растворенного вещества. Однако на окончательный профиль концентраций растворенного вещества на хроматограмме, показанный с помощью детектирующей системы, оказывают влияние и другие факторы. Основными из них являются: 1) острота профиля концентраций образца в начале хроматографирования, 2) зависимость коэффициента распределения от концентрации, 3) возможность изменения формы полосы вещества после выхода из колонки и в процессе детектирования.

Чем шире полоса образца в подвижной фазе, которую вводят в колонку или в тонкий слой, тем шире полосы, полученные после разделения, — это не требует доказательств. Поэтому в идеале образцы должны вводиться в хроматографический слой в виде "бесконечно узких" полос. Методы введения образцов в колонки и тонкие слои будут обсуждаться в следующих главах.

Зависимость коэффициента распределения от концентрации, т.е. нелинейность распределения растворенного вещества между фазами, может наблюдаться и в адсорбционной и в распределительной хроматографии, она приводит к появлению асимметричных, имеющих смещенный максимум пиков (что нежелательно для качественного анализа) и к потере разрешения. Обычно асимметричные пики получают при слишком высоких концентрациях растворенных веществ или в случае сильных полярных взаимодействий между веществами и хроматографическими фазами.

Разделенные на хроматографической колонке вещества должны быть детектированы. С этой целью элюат может быть транспортирован, например, к ультрафиолетовому детектору непрерывного действия, а тонкослойная хроматограмма может быть опрыскана подходящим выявляющим реагентом. Такие операции могут вызывать и часто вызывают еще большее размывание пиков. Эти вопросы касаются техники эксперимента, и в соответствующих разделах мы их детально обсудим.

2.10. СРАВНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КОЛОНОК И ПЛАСТИН

Рассмотренный нами механизм процесса относится к упакованным слоям вообще, т.е. и к колонкам и относительно тонким плоским слоям. Однако между этими двумя типами слоев имеются очевидные различия. С точки зрения механизма хроматографии тонкий слой от слоя в колонке отличают две важные черты. Это, во-первых, совершенно различное отношение длины и ширины слоя и, во-вторых, его "открытость".

Для колонок характерно очень высокое отношение высоты слоя к диаметру. Продольный перенос (сопровожаемый продольной диффузией) велик по сравнению с радиальной диффузией, ограниченной стенками колонки. В тонком слое мы имеем по существу двумерный слой, в котором диффузия в направлении, перпендикулярном сравнительно небольшому продольному переносу вещества, не ограничена. Следовательно, в тонких слоях размывание полосы происходит и в продольном и в радиальном направлениях. "Открытость" тонких слоев имеет как ценные преимущества, так и некоторые важные недостатки. Так, очень важное значение имеет следующее обстоятельство: из-за "открытости" тонких слоев не представляется возможным значительно изменять скорость подвижной фазы, которая определяется вязкостью и поверхностным натяжением элюента, а также температурой и геометрией камеры, в которой проводится хроматографирование. Кроме того, скорость движения элюента обычно уменьшается с увеличением расстояния от точки старта. В результате разделяемые вещества сначала подвергаются действию быстро движущегося потока подвижной фазы, скорость которого, вероятно, намного выше оптимальной. В итоге экспериментатор почти не может контролировать одну из наиболее важных переменных величин хроматографического процесса.

Преимущества и недостатки колонок и тонких слоев будут обсуждаться и в дальнейшем, но здесь мы хотим подчеркнуть, что главная непреодолимая трудность в случае использования хроматографии в тонком слое заключается в том, что скорость потока подвижной фазы нельзя контролировать. Тем не менее важно отметить, что для многих практических целей эффективность разделения методом ТСХ достаточна, а другие преимущества этого метода настолько велики, что использование в этих случаях колоночной хроматографии совершенно неоправданно.

2.11. ПРАКТИЧЕСКИЕ ВЫВОДЫ

На протяжении всего предыдущего теоретического рассмотрения механизма хроматографии мы старались подчеркивать практические выводы. В этом разделе мы попытаемся обобщить их с точки зрения

выбора материалов и условий проведения эксперимента, доступных хроматографисту. При этом, однако, нам придется ввести некоторые существенные факторы (детально обсуждаемые в следующих главах), которые неизбежно изменяют эти выводы. Мы последовательно обсудим следующие важные параметры: 1) неподвижная фаза: выбор, размер частиц, длина и толщина (диаметр) слоя; 2) подвижная фаза: выбор, скорость; 3) температура опыта; 4) аппаратура: выбор.

2.11.1. Выбор неподвижной фазы

При выборе неподвижной фазы обычно исходят из селективности, необходимой для требуемого разделения. Кроме того, необходимо учитывать свойства подвижной фазы и некоторые другие параметры. Если предполагается провести разделение сравнительно большого образца, то следует учесть емкость фазы, а в тех случаях, когда предполагается получить воспроизводимые данные по удерживанию, необходимо учесть чистоту фазы (или воспроизводимость ее свойств).

Селективность неподвижных фаз рассматривается в следующих главах. Для получения необходимого разделения может быть использован широкий диапазон свойств: молекулярный вес, полярность, соотношение между гидрофильностью и липофильностью, форма молекул, наличие специфических функциональных групп.

Все это можно с успехом использовать при выборе наиболее подходящей фазы в каждом конкретном случае. Мы не будем забежать вперед, а только подчеркнем необходимость тщательной оценки тех структурных характеристик компонентов образца, которые могут быть использованы для достижения требуемого разделения.

2.11.2. Размер частиц неподвижной фазы

Теория предсказывает, что размер частиц влияет на эффективность хроматографических разделений; практика не только подтверждает это, но и обнаруживает другие эффекты, зависящие от размера частиц, которые нельзя не учитывать.

Упомянутые нами теории утверждают, что ВЭТТ увеличивается с возрастанием размера частиц /уравнения (2.1) и (2.26)/. Далее, поскольку размеры частиц не одинаковы, этот эффект усиливается, и тем больше, чем шире диапазон размеров. Нерегулярность упаковки минимальна, если частицы одинаковы по размеру. Когда распределение частиц по размерам становится более широким, нерегулярность упаковки прогрессивно возрастает. Это происходит не только из-за перемешивания частиц разного размера, но также из-за тенденции к неоднородному распределению частиц разных размеров по слою.

Следующим теоретическим выводом является заключение, что в адсорбционной и ситовой хроматографии член, характеризующий

влияние массопередачи, зависит главным образом от глубины, на которую может проникнуть вещество в неподвижной фазе; "толщину пленки" в распределительной хроматографии приблизительно можно приравнять диаметру частиц, используемых в адсорбционной и ситовой хроматографии.

При рассмотрении вопроса о размере частиц неподвижной фазы возникает ряд экспериментальных проблем, в частности проблема эффективного заполнения колонки данным тонким материалом. Легкость адгезии тонких слоев также зависит от размера частиц. Размер частиц влияет на проницаемость колонки (а следовательно, и на перепад давления в системе), а также на скорость анализа.

Теоретически предпочтительнее работать с бесконечно малыми частицами одинакового размера. На практике дело обстоит несколько иначе. При работе с тонким слоем идеальными являются очень мелкие частицы (1–10 мкм), поскольку слои этих частиц довольно легко связываются с подложкой и нет необходимости в использовании нежелательных добавок. В настоящее время в хроматографии в колонках предельный диаметр частиц определяется сложностью заполнения колонок частицами со средним диаметром менее 20 мкм. Маловероятно, чтобы это ограничение действовало в течение долгого времени; так, уже несколько лет назад были описаны /11/ высокоэффективные колонки, заполненные субмикронными частицами. Кроме того, техника заполнения колонок постоянно совершенствуется. Влияние массопередачи на высоту тарелки можно заметно уменьшить, если использовать материалы с контролируемой поверхностной пористостью или материалы, представляющие собой твердые частицы, покрытые адсорбирующей пленкой. Для колоночной хроматографии в настоящее время можно рекомендовать частицы со средним диаметром 20–30 мкм* с распределением по размерам в пределах 15 мкм или же адсорбенты и носители с контролируемой поверхностной пористостью.

2.11.3. Размеры слоя неподвижной фазы

Длина слоя в хроматографии в тонком слое обычно не превышает 20–30 см, что связано с ограниченной способностью подвижных фаз перемещаться на большие расстояния за приемлемое время, а также с неудобствами работы с большими пластинками. В оптимальном варианте, учитывая эффективность и размер пробы, толщина слоя равна примерно 100 диаметрам частиц и обычно составляет 250 мкм. Только в препаративных работах слои часто имеют толщину вплоть до 1000 мкм.

* В настоящее время рекомендуется использовать частицы со средним диаметром 5 мкм. — *Прим. перев.*

В хроматографии в колонках ситуация более сложная и, так как некоторые требования противоречивы, решения часто бывают компромиссными. Для высокоэффективной работы можно рекомендовать колонки диаметром 1–10 мм. Чем меньше диаметр, тем сложнее проводить набивку, в то же время при увеличении диаметра уменьшается эффективность колонки. Это определяет указанные пределы. Можно рекомендовать колонки с внутренним диаметром 4 мм; именно такие колонки чаще всего используются в газовой хроматографии.

Длина колонок очень сильно зависит от необходимого числа теоретических тарелок и возможности обеспечить достаточно быстрое перемещение подвижной фазы через колонку, чтобы длительность анализа была приемлемой. В настоящее время рекомендуется применять колонки длиной, не превышающей 1 м (это близко к предельной длине неподвижной фазы, которую еще можно достаточно хорошо уплотнить для того, чтобы получить высоту тарелки порядка 1 мм при скоростях потока, не слишком далеких от оптимальной). Если разрешающая способность такой колонки недостаточна, добавляют еще одну колонку длиной 1 м, причем межколоночные коммуникации должны содержать соединительные капилляры с минимальным объемом /10/. С увеличением длины колонки уменьшается ее проницаемость, и, чтобы сохранить приемлемое время анализа, необходимо использовать более высокие давления. Для колонок с внутренним диаметром 4 мм, длиной 1 м, заполненных адсорбентом с размером частиц около 40 мкм, давление, необходимое для создания скорости потока $1 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$, равно примерно 20 атм. Поэтому приблизительную предельную длину колонки можно оценить, исходя из доступного давления и приемлемого времени анализа. Основные работы в области высокоэффективной жидкостной хроматографии проводились на колонках, длина которых не превышала 5 м.

2.11.4. Выбор подвижной фазы

При выборе жидкостей для подвижной фазы следует учитывать их физические и химические свойства. Наиболее важными факторами являются влияние подвижной фазы на селективность системы и растворимость образцов. Такие свойства, как поверхностное натяжение и вязкость, имеют меньшее значение.

Влияние подвижной фазы на селективность обсуждается ниже. Здесь следует только заметить, что в адсорбционной хроматографии использование подвижных фаз с изменяющимся составом (градиентное элюирование) по вполне понятной причине (возрастающая сила элюента) может часто значительно ускорить разделение.

Как это детально будет обсуждаться ниже, выбор подвижной фазы зависит от растворимости некоторых образцов, особенно полимеров, а также типа используемого детектора. Очевидное, но, несом-

ненно, не единственное ограничение, налагаемое типом используемого детектора, наблюдается в случае применения ультрафиолетового спектрофотометрического детектора. В системах с детектором такого типа нельзя использовать многие обычные "растворители", включая, конечно, все ароматические вещества. Если в системах, где длительность анализа велика, используются автоматические приборы, важным моментом является обеспечение безопасности работы, так как и "растворители" и анализируемые вещества могут быть токсичными или легко воспламеняться.

Динамика хроматографических процессов мало влияет на выбор подходящей подвижной фазы. Обычно вязкие жидкости нежелательны потому, что при одинаковой длительности анализа они требуют более высоких давлений, чем обычные элюенты. Влияние физических свойств подвижной фазы на размывание пика по сравнению с другими отмеченными выше факторами, весьма незначительно.

2.11.5. Скорость подвижной фазы

Мы видели, что в этом вопросе теория может сказать нам многое. Имеется оптимальная скорость потока, при которой противоречивые эффекты молекулярной диффузии (уменьшающиеся при высоких скоростях) и сопротивление массопередаче (уменьшающееся при низких скоростях) находятся в равновесии. Низкие значения коэффициентов молекулярной диффузии в жидкостях дают возможность сделать вывод, подтвержденный практическими наблюдениями, что оптимальные линейные скорости должны быть низкими. Типичное значение оптимальной скорости для колонок с внутренним диаметром 4 мм равно 10^{-1} см·с⁻¹, что приблизительно соответствует объемной скорости 10^{-1} мл·мин⁻¹. К счастью, в жидкостной хроматографии при скоростях выше оптимальной ВЭГТ возрастает сравнительно медленно /10/. Поэтому даже при скоростях 1–10 см·с⁻¹ высоты тарелок только в 2–10 раз больше, чем оптимальные. Следовательно, медленный в своей основе процесс жидкостной хроматографии высокого разрешения можно ускорить, причем потеря разрешающей способности в этом случае будет меньше, чем при газохроматографических разделениях.

2.11.6. Температура

Коэффициенты распределения зависят от температуры, поэтому некоторые разделения можно значительно улучшить в результате изменения температуры. Как было показано в работе /11/, в адсорбционных системах происходят и другие, более тонкие явления, которые могут обеспечить улучшенную селективность. Характеристика колонки лишь косвенно зависит от температуры, так как последняя влия-

яет на такие свойства, как вязкость и коэффициент диффузии. Обычно разделение методом жидкостной хроматографии проводят при комнатной температуре. Принципиальным преимуществом при использовании более высоких температур является, вероятно, возможность получения больших скоростей анализа, хотя с повышением температуры факторы разделения имеют тенденцию к уменьшению. В адсорбционной хроматографии ускорение анализа может быть достигнуто с большим успехом при использовании градиентного элюирования.

2.11.7. Аппаратура

На легкость достижения соответствующего разделения в приемлемое время влияют: 1) длина и диаметр колонок, совместимых с имеющейся насосной системой, 2) оборудование для введения пробы и 3) детектирующая система, вызывающая минимальное внеколоночное размывание.

Список литературы

1. *Giddings J.C.*, Dynamics of Chromatography, Part I, Marcel Dekker, New York, 1965.
2. *Wilson J.N.*, J. Am. Chem. Soc., **62**, 1583 (1940).
3. *Martin A.J.P.*, *Syngé R.M.*, Biochem. J., **35**, 1358 (1941).
4. *Van Deemter J.J.*, *Zuiderwég F.J.*, *Klinkenberg A.*, Chem. Eng. Sci., **5**, 271 (1956).
5. *Giddings J.C.*, Dynamics of Chromatography, Part I, Marcel Dekker, New York, 1965, p. 242 – 243.
6. *Wilke C.R.*, *Chang P.*, Am. Inst. Chem. Eng. J., **1**, 264 (1955).
7. *Giddings J.C.*, Dynamics of Chromatography, Part I, Marcel Dekker, New York, 1965, p. 35.
8. *Frenkel J.*, Kinetic Theory of Liquids, Oxford Univ. Press, Chapter 4, 1946.
9. *Kelley R.N.*, *Billmeyer F.W., Jr.*, Anal. Chem., **41**, 874 (1969).
10. *Stewart H.N.M.*, *Amos R.*, *Perry S.G.*, J. Chromatog., **38**, 209 (1968).
11. *Maggs R.J.*, *Young T.E.*, Gas Chromatography 1968, Harbourn C.L.A., ed., Inst. Petroleum, London, 1969.

Список дополнительной литературы

- Knox J.H.*, *Saleem H.*, J. Chromatog. Sci., **7**, 614 (1969). Обсуждение кинетических условий, позволяющих получать оптимальные скорости и оптимальное разрешение в хроматографии в колонках.
- Smuts T.W.*, *van Niekerk F.A.*, *Pretorius V.*, J. Gas Chromatog., **5**, 190 (1967). Рассматривается влияние рабочих параметров на скорость хроматографирования методом ЖХ.
- Hubert J.F.K.*, in "Physical Separation Methods", Vol. IIB, *Wilson C.L.*, *Wilson D.W.* eds, Elsevier, Amsterdam, Chapter 1, 1968. Основные положения теории жидкостной хроматографии в колонках.

АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. МЕХАНИЗМ ПРОЦЕССА И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

3.1. ВВЕДЕНИЕ

Адсорбцию можно определить как концентрирование молекул растворенного вещества на границе раздела двух несмешивающихся фаз. В жидкостной адсорбционной хроматографии, где процессы разделения происходят на границе раздела жидкость – твердое тело, подвижной фазой является жидкость, а неподвижной – тонкоизмельченные обычно пористые твердые тела. Силы, действующие на атомы в объеме твердого тела, во всех направлениях уравновешены, тогда как атомы на поверхности испытывают действие несбалансированных сил, которые могут притягивать молекулы из окружающего пространства, чтобы восстановить равновесие.

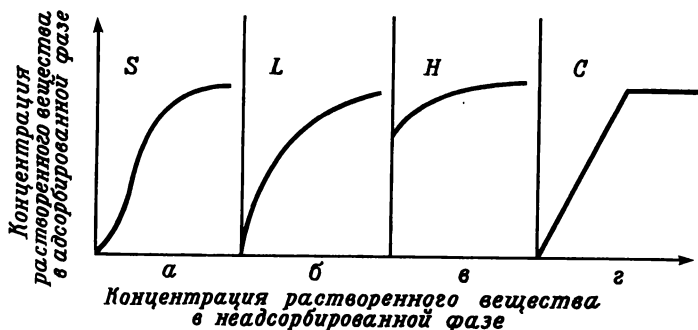
В многокомпонентной системе происходит селективная адсорбция, обусловленная конкуренцией между молекулами разделяемых веществ и подвижной фазы за поверхность. Степень конкуренции определяется различиями в величинах адсорбционных сил, действующих между адсорбентом и адсорбатами. Обычно полярные соединения адсорбируются полярными твердыми телами сильнее, чем неполярными. Адсорбция полярных соединений усиливается в неполярной среде, но уменьшается в полярной вследствие возрастающей конкуренции подвижной фазы за поверхность. Обычным способом изучения адсорбции является измерение изотерм адсорбции.

3.2. ИЗОТЕРМЫ АДСОРБЦИИ

Изотерма адсорбции описывает соотношение между равновесными концентрациями в адсорбированной и неадсорбированной части растворенного вещества при данной температуре. Она представляет собой график зависимости концентрации растворенного вещества в адсорбированной фазе от его концентрации в неадсорбированной фазе. Гилес и др. [1] классифицировали адсорбцию растворенного вещества из растворителя на поверхности твердого тела в соответствии со схемой, приведенной на рис. 3.1.

1. S-образная изотерма представляет такой вариант адсорбции, когда по мере увеличения количества адсорбированного вещества адсорбция растворенного вещества облегчается. Молекулы, уже адсор-

бированные на поверхности, на наиболее активных центрах, помогают дальнейшей адсорбции благодаря образованию межмолекулярных связей. Такие изотермы, как установлено, обычно, но не всегда наблюдаются при адсорбции на поверхности адсорбента плоских молекул ребром; примером может служить фенол, адсорбированный на окиси алюминия. В этом случае гидроксильная группа образует, вероятно, водородную связь с поверхностными атомами кислорода окиси алюминия, а ароматические ядра ассоциируют с другими молекулами растворенного вещества.



Р и с. 3.1. Основные типы изотерм адсорбции на границе раздела жидкость – твердое тело.

2. *L*-Изотерма (или нормальная изотерма Ленгмюра) наиболее характерна для жидкостной адсорбционной хроматографии. В ходе адсорбции адсорбент сначала заполняет наиболее активные центры, и легкость, с которой происходит адсорбция, убывает после того, как будет заполнен монослой и все адсорбционные центры будут заняты. Изотермы этого типа обычно наблюдаются в тех случаях, когда молекулы адсорбируются плоско и в отсутствие межмолекулярных взаимодействий (связей).

3. *H*-Изотерма (высокое сродство) типична для хемосорбции. Положительному значению адсорбции соответствует нулевая равновесная концентрация; это указывает, что все растворенное вещество удаляется из разбавленного раствора.

4. *C*-Изотерма (постоянное распределение) линейна. Это означает, что легкость адсорбции остается постоянной. Этот тип изотермы часто наблюдается в распределительной хроматографии и редко в жидкостной адсорбционной хроматографии.

Изотермы адсорбции можно далее подразделить в соответствии с наличием последующих изгибов и плато. Обычно дальнейший рост,

следующий за начальным плато, или просто изгиб указывает на образование второго слоя или в некоторых случаях на переориентацию первого слоя.

На некоторых изотермах, главным образом L и H , наблюдались максимумы*. Растворенные вещества могут ассоциировать в растворе, и предполагают, что при высоких концентрациях вследствие ассоциации некоторая часть адсорбированного вещества может вернуться в раствор.

Нелинейные изотермы рассматриваются в том разделе, где говорится об адсорбционной хроматографии.

3.3. ПРИРОДА АДсорбЦИОННЫХ СИЛ

В адсорбционной хроматографии разделение обусловлено действием адсорбционных сил, которые можно классифицировать следующим образом.

3.3.1. Вандерваальсовы силы (лондоновские дисперсионные силы)

Это межмолекулярные силы, которые удерживают вместе нейтральные молекулы в жидком или твердом состоянии. Они являются чисто физическими по характеру и не предполагают образования каких-либо химических связей. Адсорбция, являющаяся результатом действия сил указанного типа, известна как физическая адсорбция; она характеризуется низкими энергиями адсорбции, ведущими к быстрому установлению равновесия и поэтому к хорошему хроматографическому разделению.

Дисперсионными силами обусловлена вся энергия адсорбции в случаях адсорбции неполярных веществ на неполярных адсорбентах, например углеводородов на графите. Снайдер /2/ показал, что вклад дисперсионных сил в энергию адсорбции на окиси алюминия меняется от 100% для насыщенных углеводородов до менее чем 50% для полярных молекул, таких, как ацетон и метанол.

3.3.2. Индукционные силы

Эти силы наблюдаются в тех случаях, когда химическая связь имеет постоянное связанное с ней электрическое поле, например $C-CI$ или $C-NO_2$. Под влиянием этого поля электроны соседнего атома, группы или молекулы поляризуются таким образом, что дают индуцированный дипольный момент. По-видимому /2/, индукционные силы играют основную роль в адсорбции на окиси алюминия (но не на двуокиси кремния).

*При определенных концентрациях максимум адсорбции должен наблюдаться во всех случаях адсорбции из растворов, если адсорбционный раствор не расслаивается. — *Прим. перев.*

3.3.3. Водородная связь

Эти силы вносят важный вклад в энергию адсорбции веществ, имеющих протонодонорную группу, на нуклеофильной полярной поверхности. Такой поверхностью обладает, например, двуокись кремния или окись алюминия. Обычно эта поверхность покрыта гидроксильными группами, которые могут реагировать подобным же образом с другими слабо электрофильными группами, такими, как эфиры, нитрилы или ароматические углеводороды.

3.3.4. Перенос заряда

Перенос заряда возможен в тех случаях, когда электрон переносится от растворенного вещества S к центру на поверхности A и образуется адсорбированный комплекс типа S^+A^- . Однако, как было показано в работе [2], силы, обусловленные переносом заряда, не вносят существенного вклада в энергию адсорбции большинства соединений.

3.3.5. Ковалентная связь (хемосорбция)

Образование ковалентной связи наблюдается в тех случаях, когда между веществом и адсорбентом образуются химические связи. Эти сравнительно сильные химические силы вызывают появление изотерм H -типа и обычно ведут к плохому разделению в элютивной хроматографии. Хемосорбция часто используется для селективного удерживания соединений некоторых типов. Примерами могут служить адсорбция аминов катионообменными смолами, адсорбция олефинов двуокисью кремния, пропитанной нитратом серебра. Изотермы H -типа часто наблюдаются в высокоэффективной элютивной хроматографии. Они могут быть вызваны хемосорбцией некоторых растворенных веществ на тех активных центрах поверхности адсорбента, которые не были полностью дезактивированы. Например, поверхность двуокиси кремния может содержать некоторые остаточные кислотные центры, которые адсорбируют основания. Аналогично окись алюминия содержит центры основного характера, которые сильно хемосорбируют кислоты. Флорисил (силикат магния) также содержит сильные кислотные центры и, как было отмечено, хемосорбирует ряд соединений, включая ароматические углеводороды, азотсодержащие соединения, обладающие основным характером, и эфиры, в то же время окись магния хемосорбирует полиядерные ароматические углеводороды. Следствием хемосорбции в колонках является появление полос, имеющих сильно растянутые "хвосты", что ведет к неполному разрешению и извлечению образца. В ТСХ в этих случаях часть образца, очевидно, должна оставаться сзади в виде пятна в точке введения пробы. В конце этой главы приведен список дополнительной литературы, где подробно рассматривается хемосорбция.

3.4. Выбор хроматографической системы в адсорбционной хроматографии

При разработке подходящего хроматографического эксперимента в адсорбционной хроматографии следует учитывать следующие факторы: 1) выбор адсорбента, 2) размер образца и его линейную емкость*, 3) стандартизацию адсорбента, 4) выбор подвижной фазы, 5) метод детектирования или количественного определения.

Вопросы, касающиеся метода детектирования или измерения, будут рассматриваться в соответствующих главах отдельно для хроматографии в тонком слое и в колонке. Следует, однако, заметить, что используемая система детектирования может влиять, особенно в хроматографии в колонке, на выбор подвижной фазы. Кроме того, метод детектирования определяет требуемый размер образца. Ниже мы обсудим каждый из остальных четырех факторов.

3.4.1. Выбор адсорбента

а. Общие свойства адсорбентов

В ЖАХ в качестве адсорбентов используются тонкоизмельченные пористые материалы с удельной поверхностью обычно больше $50 \text{ м}^2 \text{ г}^{-1}$. В табл. 3.1 приведены наиболее часто употребляемые адсорбенты, расположены они приблизительно в порядке возрастающей активности. Активные адсорбенты, т.е. адсорбенты с относительно большой концентрацией высокоактивных центров, предпочтительны для разделения

Таблица 3.1

Активированные адсорбенты, расположенные
в порядке возрастания активности

Адсорбент	Природа активных центров
Сахароза	Нейтральная
Крахмал	"
Диатомит	"
Двуокись кремния	Кислотная
Силикат магния	"
Оксид алюминия	Кислотные и основные центры
Фуллерова земля	Кислотная
Оксид магния	Основная
Активный уголь	Нейтральная и кислотная
Ионообменные смолы	Кислотные или основные группы

* Термины "размер" и "линейная емкость" поясняются авторами в разд. 3.4.2. — *Прим. ред.*

слабо адсорбируемых, химически инертных соединений, таких, как углеводороды, тогда как инертные адсорбенты предпочтительны для разделения нестойких или сильно адсорбируемых соединений.

Природа поверхности адсорбентов не всегда соответствует указанной в таблице, так как поверхность часто модифицируется свободной кислотой или основанием, оставшимися после стадии изготовления, или в результате преднамеренного добавления буферных агентов.

В качестве адсорбентов можно также использовать сульфат кальция, тальк, полиамиды, модифицированные глины и молекулярные сита. Ряд селективных адсорбентов был приготовлен посредством пропитки адсорбентов материалами, образующими комплексы с специфическими органическими функциональными группами. Например, пропитанный нитратом серебра силикагель использовался для разделения ненасыщенных углеводородов. Другие примеры будут рассмотрены в разделе, посвященном модифицированным адсорбентам.

Силикагель и окись алюминия, несомненно, являются двумя наиболее часто используемыми адсорбентами. В настоящее время многие адсорбенты выпускаются промышленностью, более того, выпускаются и широко используются готовые пластинки для хроматографии в тонком слое с нанесенным слоем и постепенно вводятся предварительно заполненные высокоэффективные колонки. Список поставщиков хроматографических силикагеля и окиси алюминия приведен в работе /35/. В табл. 3.2 перечислены некоторые поставщики других

Таблица 3.2

Некоторые поставщики адсорбентов^a

Адсорбент	Фирменное название	Фирма, выпускающая адсорбент
Силикат магния	—	Hopkin and Williams, Ltd. Chadwell Heath, Essex England
	—	M. Woelz, D-344, Eschwege, W. Germany
	Флорисил (Florisil)	Floridin Co., Pittsburgh, Pa. 15235
Окись магния	—	Hopkin and Williams, Ltd. Chadwell Heath, Essex England
Сажа	Графон (Graphon), сферон (Spheron)	Cabot Corp., Cambridge, Mass.
Ионообменные смолы	Амберлит (Amberlyst)	Rohm and Haas, Co., Independence Mall West, Philadelphia, Pa., 19105

Адсорбент	Фирменное название	Фирма, выпускающая адсорбент
Стеклянные шарики с модифицированной поверхностью	Зипакс (Zipax), Пермафаза (Perma-phase) Корасил (Corasil)	E.I. Du Pont de Nemours and Co., Wilmington, Del. 19898 Waters Associates, Inc., 61 Fountain Street, Framingham, Mass., 01701
Поверхностно-гравленные шарики	Корнинг (Corning glass beads)	Corning Glass Works, Corning, N.Y., 13840

^aКроме силикагеля и окиси алюминия.

адсорбирующих материалов, о которых мы будем говорить в данной главе. При выборе подходящего адсорбента необходимо обсудить "тип адсорбента" (т.е. его активность, природу активных мест, pH поверхности), величину удельной поверхности и диаметр пор.

б. Тип адсорбента

Различные типы адсорбентов проявляют неодинаковую селективность по отношению к соединениям разных типов. Полярные адсорбенты (окислы металлов, силикат магния и т.д.) селективно адсорбируют ненасыщенные, ароматические и полярные молекулы, такие, как спирты, амины и кислоты. Полярные адсорбенты можно далее подразделить на кислотные, основные и нейтральные в соответствии с величиной pH поверхности. Двуокись кремния, силикат магния и катионообменные смолы относятся к числу кислотных адсорбентов, и они хемосорбируют основания. Хотя хемосорбция является эффективным методом концентрирования, количественное хроматографическое разделение в этом случае невозможно из-за трудности десорбции. Основания лучше всего разделяются на адсорбентах основного характера, например окиси магния. Аналогично адсорбенты основного характера хемосорбируют кислоты, и последние лучше разделять на кислотных адсорбентах. На поверхности окиси алюминия содержатся как кислотные, так и основные центры, но она является отличным адсорбентом для ненасыщенных и ароматических соединений.

Неполярные адсорбенты, например графитированная сажа (активный адсорбент), и кизельгур, или диатомит (слабый адсорбент), не проявляют селективности по отношению к полярным молекулам. Кизельгур относится к числу настолько слабых адсорбентов, что его используют в качестве неактивного твердого носителя неподвижной фазы в жидкостной распределительной хроматографии (см. гл. 4).

в. Величина удельной поверхности и диаметр пор

Величина удельной поверхности и диаметр пор адсорбента значительно меняются в зависимости от метода его получения. Вероятно, не найдется двух заводов-изготовителей, которые выпускали бы силикагели с одинаковой удельной поверхностью и диаметром пор. Изменения в свойствах различных партий данного класса адсорбентов, полученных одной и той же фирмой, обычно невелики. Однако иногда наблюдаются очень значительные изменения в свойствах, обусловленные, вероятно, изменениями в условиях процесса производства. Следует обращать внимание на те случаи, когда одна и та же фирма производит продукцию на заводах, расположенных в разных местах. Свойства адсорбентов, полученных на разных заводах, редко бывают идентичными. Поэтому рекомендуется обращать особое внимание на свойства используемого им адсорбента и всегда, когда это возможно, стандартизировать его по какому-либо специфическому свойству.

В качестве адсорбентов в хроматографии применяют пористые твердые материалы, удельная поверхность которых обычно превышает $50 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, что позволяет обеспечить достаточную емкость по разделяемым веществам. Величина поверхности возрастает с увеличением пористости и уменьшением среднего диаметра пор. Линейный адсорбционный коэффициент K^0 вещества не зависит от этих двух параметров, поскольку молекулы растворенного вещества достаточно малы для того, чтобы беспрепятственно проникать в поры, а природа активных центров поверхности не зависит от диаметра пор. Однако далее мы увидим, что, например, в случае силикагеля большие различия в диаметрах пор приводят к различиям в структуре поверхности. Если размер молекулы вещества сравним с диаметром пор или превышает его, то преобладает ситовой, а не адсорбционный эффект (ситовые эффекты рассматриваются в гл. 5).

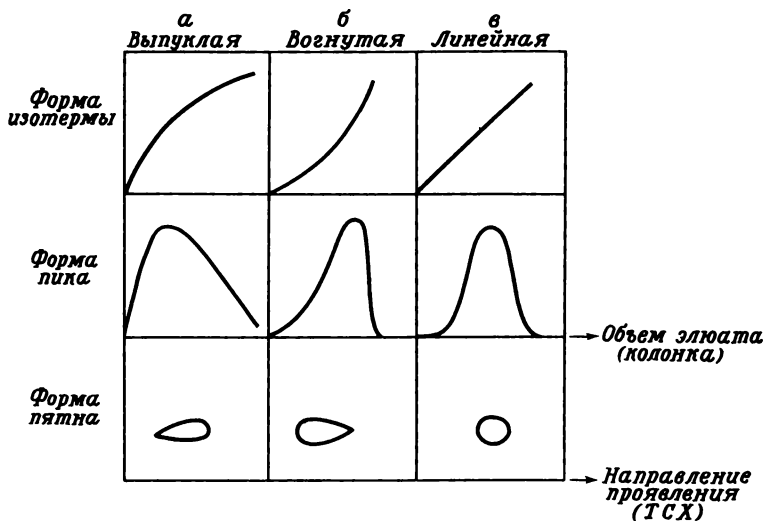
3.4.2. Размер образца и линейная емкость

а. Размер образца и форма полосы

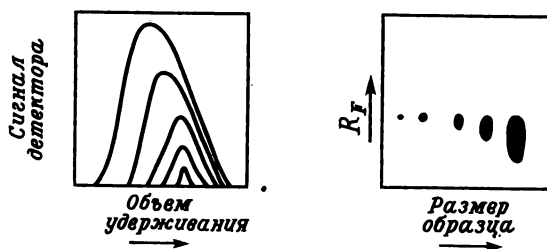
В аналитической жидкостной адсорбционной хроматографии используются сравнительно низкие концентрации образца, поэтому на изотермах адсорбции следует обсудить только области низкой концентрации. В этих областях изотермы имеют три возможные формы: выпуклую (L -тип), вогнутую (S -тип) и линейную (C -тип). На рис. 3.2 показаны соответствующие им хроматографические пики или пятна.

Таким образом, в случае выпуклых изотерм, которые характерны для ЖАХ, адсорбционный коэффициент K убывает с возрастанием размера образца. Только при очень низких загрузках изотерму можно рассматривать как приблизительно линейную. На рис. 3.3 по-

казано наблюдаемое на практике влияние увеличения пробы на форму полосы в хроматографии в колонке и на величину удерживания в хроматографии в тонком слое. При очень низких нагрузках V_r и R_F , по-видимому, остаются постоянными. Однако, когда нагрузка увеличивается, достигается точка, в которой V_r и R_F заметно убы-



Р и с. 3.2. Влияние вида изотерм на форму элюируемой полосы или пятна.



Р и с. 3.3. Влияние размера образца на форму полосы и удерживание.

вают. Дальнейшее увеличение размера образца в конце концов ведет к возрастанию степени размывания "тыла" полосы, ухудшению разрешения и даже к неполному вымыванию.

б. Линейность изотермы

Предположение о линейности изотермы является необходимым для развития любой общей теории адсорбционной хроматографии. Такая теория позволяет понять поведение системы в неидеальных случаях разделения. Линейность изотермы означает, что R_F , V_r и K постоянны для данной системы при заданной температуре, т.е. не зависят от концентрации, что облегчает идентификацию разделенных зон по величинам удерживания. Кроме того, в случае линейных изотерм хроматографические пики имеют форму кривой Гаусса или симметричных пятен, что позволяет улучшить разрешение.

До 1950 г. предполагалось, что изотермы адсорбции в жидкостной хроматографии обычно нелинейны. Это совершенно правильно в тех случаях, когда отношение величины образца к количеству адсорбента велико. Такое положение обычно имело место раньше, а часто наблюдается и сейчас. В пятидесятых годах во время интенсивного развития ТСХ было установлено, что в тех условиях, которые обычно применяются в ТСХ, не только достигаются более быстрые и четкие разделения, но и обычной является симметричная форма пятна. Это подтверждает, что на дезактивированных адсорбентах при работе с малыми образцами легко получить линейную изотерму. Практические преимущества разделений в колонках при линейных изотермах полностью используются только в течение нескольких последних лет.

в. Линейная емкость

Линейная емкость адсорбента была определена [3] как максимально допустимый вес образца, приходящийся на 1 г адсорбента, при использовании которого адсорбционный коэффициент K уменьшится не более чем на 10% его величины для линейной изотермы K^0 . Это означает, что, пока размер образца не превысит линейной емкости адсорбента, V_r и R_F индивидуальных растворенных веществ будут в пределах 10% соответствовать их значениям для линейной части изотермы адсорбции.

Линейная емкость наиболее активных адсорбентов очень низка ($< 10^{-4}$ г/г). Поэтому желательно ее увеличить, чтобы иметь возможность увеличить нагрузки и облегчить детектирование и дальнейшее обращение с компонентами образца, однако прежде чем перейти к этому вопросу, рассмотрим некоторые причины нелинейности изотермы в адсорбционной хроматографии.

г. Причины нелинейности изотермы

Нелинейность изотерм вызывается тремя основными причинами [2]:

1. *Заполнение поверхности.* Исходя из теории изотермы Ленгмюра, можно показать, что изотерма адсорбции становится нелинейной

при заполнениях больших, чем 10%. Это определяет максимальную возможную линейную емкость данного адсорбента по отношению к данному веществу. Можно рассчитать, что примерно 0,03 г типичного органического соединения образовали бы монослой на 100 м^2 поверхности. Таким образом, максимальная линейная емкость адсорбента с удельной поверхностью $100 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ составляла бы $0,003 \text{ г} \cdot \text{г}^{-1}$. Однако действительные емкости обычно намного меньше.

2. *Взаимодействие соседних адсорбированных молекул образца.* Такие взаимодействия незначительны при низких степенях заполнения, налагаемых указанным выше ограничением, и поэтому мы их рассматривать не будем.

3. *Неоднородность адсорбента* возникает из-за того, что не все адсорбционные центры на поверхности эквивалентны. Некоторые центры, как принято говорить, более "активны", чем другие. С ростом неоднородности уменьшается линейная емкость. При небольшом числе очень активных центров линейная емкость значительно уменьшается, так как молекулы растворенного вещества занимают в первую очередь эти центры. Отклонение от линейности наблюдается после заполнения 10% активных центров. Поэтому неоднородность является главной причиной низких линейных емкостей и следует рассмотреть пути ее преодоления.

д. Увеличение линейной емкости

Более активные центры неоднородной поверхности могут быть дезактивированы добавлением полярного растворителя, такого, как вода. Линейная емкость при этом увеличивается. Приведенные в табл. 3.3 данные показывают влияние дезактивации водой на удерживаемый объем и линейную емкость трех силикагелей, отличающихся по пористости и величине поверхности.

Приведенные в табл. 3.3 данные, а также данные для среднепористой окиси алюминия (Alcoa F-20), предварительно активированной при 400°C , показаны на рис. 3.4. Силикагель с широкими порами (рис. 3.4, а) имеет сравнительно однородную поверхность и низкую удельную поверхность. Поскольку неоднородность в большей степени, чем величина поверхности, влияет на линейную емкость, то последняя у активированного силикагеля с крупными порами выше, чем у силикагеля с средними (рис. 3.4, б) или тонкими (рис. 3.4, в) порами. Силикагель с крупными порами содержит мало активных центров, поэтому максимум линейной емкости достигается после добавления сравнительно небольшого количества воды. Дальнейшее добавление воды приводит к заполнению оставшейся однородной поверхности, что вызывает уменьшение линейной емкости. Силикагель с тонкими порами имеет большую удельную поверхность и довольно неоднородную поверхность. Вследствие этого линейная емкость активи-

рованного адсорбента низка. Для дезактивации всех активных центров такого силикагеля требуется большее количество воды, но после полной дезактивации линейная емкость его больше, чем у силикагеля с крупными порами, поскольку тонкопористый образец имеет большую удельную поверхность.

Таблица 3.3

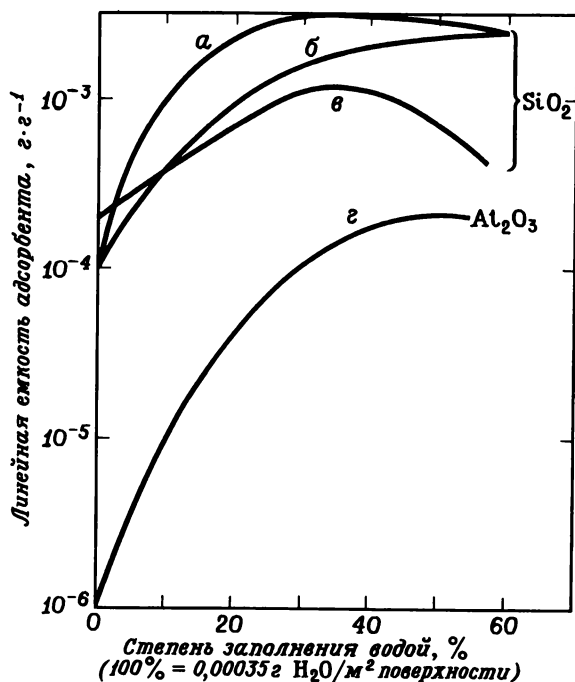
Объемы удерживания и линейная емкость
при элюировании нафталина пентаном с различных силикагелей,
предварительно активированных при 195°C [2]

Размер пор	Силикагель	Удельная поверхность исходного образца, $\text{м}^2/\text{г}^{-1}$	Добавлено воды, %	V_r , $\text{мл} \cdot \text{г}^{-1}$	Линейная емкость	
					$\times 10^{-4}$, $\text{г} \cdot \text{г}^{-1}$	$\times 10^{-7}$, $\text{г} \cdot \text{м}^{-2}$
Тонкие	Davison Code 12	801	0	51,9	0,9	1,1
			2,0	25,1	7,5	
			7,5	6,3	29	
			16,0	1,84	26	
Средние	Davison MS	866	0	46,4	1,0	1,2
			2,1	18,0	2,5	
			7,9	5,0	15	
			16,8	2,16	25	
Крупные	Davison Code 62	313	0	6,5	1,9	6
			0,8	4,42	2,9	
			2,9	2,74	11	
			6,2	1,77	4,2	

В общем, мы можем сказать, что при добавлении 1–2% воды на $100 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ поверхности (что соответствует 30–60%—ному заполнению в случае полярных адсорбентов, таких, как окись алюминия, силикагель и другие окислы металлов) линейная емкость увеличивается в 5–100 раз. При использовании сильно полярных элюентов или высоких температур физически адсорбированная вода десорбируется, в результате чего происходит реактивация адсорбента и линейная емкость уменьшается. В таких случаях дезактивацию лучше проводить с помощью гликолей или глицерина [5]. Дезактивация таких адсорбентов, как уголь (которые не адсорбируют воду), может быть достигнута с помощью некоторых органических соединений со значительным молекулярным весом, например цетилового спирта или стеариновой кислоты [6].

Линейную емкость неоднородного адсорбента можно также повысить, уменьшив значение адсорбционного коэффициента K . Этого можно достичь либо посредством повышения температуры, либо путем

увеличения полярности растворителя. Однако в связи с тем, что полярные адсорбенты имеют тенденцию терять адсорбированную воду при нагревании, может оказаться, что адсорбент станет еще более активированным, чем исходный. В этом случае его поверхность бу-



Р и с. 3.4. Зависимость линейной емкости адсорбента от типа адсорбента и относительной дезактивации водой [2].

дет более неоднородной. Во втором случае следует помнить, что чрезмерное уменьшение K может привести к ухудшению разделения.

Поэтому наиболее целесообразно увеличивать линейную емкость неоднородной поверхности посредством дезактивации активных центров добавлением полярной жидкости.

е. Линейные емкости в колонках и тонких слоях

В любой момент времени полоса растворенного вещества в колонке находится в контакте только с частью общего количества адсорбента в колонке. Это означает, что линейная емкость колонки

связана с шириной полосы растворенного вещества $72/$. В эффективной колонке полосы растворенного вещества узкие и поэтому линейная емкость сравнительно низкая. Однако поскольку эффективные колонки обычно используют для анализа сложных смесей, то в процессе разделения в контакте с адсорбентом в любой момент времени находится несколько различных веществ, поэтому линейная емкость эффективной колонки возрастает с увеличением сложности смеси. Те компоненты, которые совсем не адсорбируются, при расчете линейной емкости колонки можно не учитывать.

В аналитической ТСХ чувствительность используемых методов детектирования такова, что позволяет обнаруживать компоненты образца, содержание которых меньше 1 мкг. В обычной практике следует использовать образцы по 10–50 мкг для слоев адсорбента толщиной 250 мкм; такая толщина является оптимальной с точки зрения максимальной скорости и качества разрешения. Указанные нагрузки значительно ниже максимальной линейной емкости (75 мкг) которая получена в предположении, что проба образует пятно площадью 1 см² на слое силикагеля толщиной 250 мкм на пластине и хроматограмма проявляется обычным способом (см. гл. 6).

3.4.3. Стандартизация адсорбента

Величина K^0 данного вещества в выбранной системе подвижная фаза – адсорбент зависит от удельной поверхности и активности адсорбента и может отличаться из-за различия в процессах производства адсорбентов, их термической обработки и дезактивации конечного продукта. Между тем в высшей степени желательно получать воспроизводимые значения K^0 , так как в этом случае результаты эксперимента будут воспроизводимыми, а значения R_F и V_r можно точно измерить и использовать для идентификации соединений. Приведенное ниже уравнение показывает, каким образом удельная поверхность и поверхностная энергия адсорбента влияют на значение K^0 $/7/$.

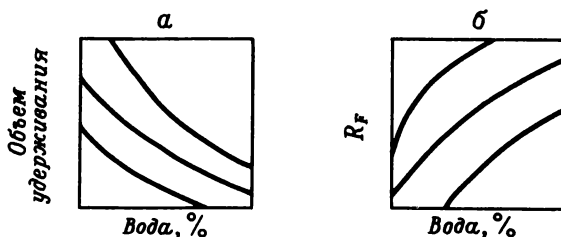
$$\log K^0 = \log V_a + \alpha (S^0 - A_s \epsilon^0), \quad (3.1)$$

где V_a – адсорбционный объем адсорбента, равный объему моно слоя растворителя (чтобы его приблизительно оценить, необходимо умножить удельную поверхность на 0,00035); α – функция энергии адсорбента, пропорциональная его средней поверхностной энергии; параметр $(S^0 - A_s \epsilon^0)$ – постоянная величина для выбранной системы растворенное вещество – элюент – адсорбент. Справедливость уравнения (3.1) была экспериментально подтверждена для ряда систем $/7/$.

Значения V_a и α для некоторых обычных адсорбентов, дезактивированных добавлением различных количеств воды, табулирова-

ны /77/. Результаты показывают, что V_a и a регулярно убывают с увеличением содержания воды. Для определения зависимости V_r или R_F от содержания воды были построены семейства кривых (рис. 3.5), где каждая кривая соответствует определенному значению ($S^0 - A_s \epsilon^0$). Эти кривые показывают, что уменьшение активности адсорбента увеличивает подвижность разделяемого компонента.

Чтобы приготовить стандартизованный адсорбент, надежнее всего считать, что содержание воды в поступающем в продажу адсорбенте неизвестно. В ТСХ стандартизация пластин достигается путем выдерживания их до установления равновесия в емкости с известной относительной влажностью. Детально этот метод рассматривается в гл. 6. В колоночной хроматографии адсорбент сначала нагревается на воздухе в течение 4–16 ч при некоторой определенной температуре; цель этой операции – удалить адсорбированную воду (см. разд. 3.6). Это позволяет получить адсорбент с определенной (пусть и неизвестной) активностью и содержанием воды. После этого проводится дезактивация: к определенному количеству активированного адсорбента, помещенного в закрытый сосуд, добавляют необходимое количество воды или другого дезактиватора. Некоторое время адсорбент энергично встряхивают, чтобы диспергировать комки, затем оставляют на 24 ч при периодическом встряхивании. В течение этого времени



Р и с. 3.5. Влияние дезактивации водой на объем удерживания (а) и на значение R_F (б).

добавленный дезактиватор распределяется равномерно по всей поверхности адсорбента. Приготовленные таким образом адсорбенты неограниченно долгое время сохраняют свои свойства, если их хранят в плотно закрытых емкостях.

Активность обработанного таким образом адсорбента проверяют стандартным методом. В ТСХ смесь трех красителей: индофенола голубого, *n*-диметиламиноазобензола и судана красного G, приготовленную путем растворения 50 мг каждого растворителя в 50 мл бензола, проявляют бензолом, используя стандартный метод (см. гл. 6).

Измеряют значения R_F и, если необходимо увеличить или уменьшить активность, то изменяют относительную влажность в камере, где хранятся пластинки.

В хроматографии в колонке ту же смесь красителей элюируют бензолом и измеряют объемы удерживания. В этом случае необходимое изменение активности достигается следующим образом. К образцовому указанному выше способу адсорбенту добавляют небольшое количество воды или сухого (активированного) адсорбента и выдерживают до установления равновесия в течение 24 ч. В настоящее время в качестве стандартного метода часто используют элюирование нафталина *n*-пентаном, так как эта система легко поддается определению с помощью многих современных чувствительных детекторов.

Известно, что в ряде случаев наблюдаются отклонения от уравнения (3.1). Это происходит, например, при использовании растворителей, которые достаточно полярны для того, чтобы вытеснить воду с поверхности адсорбента при работе с флорисилом, содержащим менее 1% воды /2/, а также при одновременном использовании адсорбентов с очень тонкими порами и таких растворителей, молекулы которых имеют большой диаметр. Примером может служить элюирование четыреххлористым углеродом из тонкопористого силикагеля (средний диаметр пор 20 Å).

3.4.4. Выбор подвижной фазы

После того как выбран тип адсорбента и в соответствии с максимальной линейной емкостью стандартизована его активность, наиболее важным методом корректировки K^0 с целью получения оптимальных значений R_F или V_r является выбор подвижной фазы соответствующей элюирующей силы. Влияние подвижной фазы на K^0 выражается членом $(S^0 - A_s \epsilon^0)$, входящим в уравнение (3.1), где S^0 — энергия адсорбции вещества на адсорбент со стандартной активностью ($\alpha = 1$), A_s — величина, пропорциональная молекулярной площадке разделяемого вещества, а величина ϵ^0 определяется как элюирующая сила. Чем больше элюирующая сила, тем меньше значение K^0 для данного растворенного вещества и адсорбента.

Значения ϵ^0 по отношению к *n*-пентану, для которого ϵ^0 равно 1, были определены для ряда растворителей на окиси алюминия /2/. Расположение растворителей в порядке возрастания элюирующей силы дает так называемые элюотропные ряды (табл. 3.4). Для всех полярных адсорбентов наблюдается одинаковый порядок изменения элюирующей силы, он меняется только для графитированной сажи, поскольку этот адсорбент предпочтительно адсорбирует неполярные молекулы.

Таблица 3.4

Элюотропные ряды для полярных адсорбентов

Растворитель	$\epsilon^0(\text{Al}_2\text{O}_3)$	Вязкость при 20°C, П	n_D	Граница пропус- кания УФ, нм	Темпера- тура ки- пения, °C
Фторзамещенные алканы	-0,25	-	1,25	-	-
n- Пентан	0,00	0,23	1,358	210	36
Изооктан	0,01	0,54	1,404	210	118
n- Гептан	0,01	0,41	1,388	210	98,4
n- Декан	0,04	0,92	1,412	210	174
Циклогексан	0,04	1,00	1,427	210	81
Циклопентан	0,05	0,47	1,406	210	49,3
Сероуглерод	0,15	0,37	1,626	380	45
Четыреххлористый углерод	0,18	0,97	1,466	265	76,7
Хлористый амил	0,26	0,43	1,413	225	108,2
Изопропиловый эфир	0,28	0,37	1,368	220	69
Хлористый изопропил	0,29	0,33	1,378	225	34,8
Толуол	0,29	0,59	1,496	285	110,6
Хлористый пропиол	0,30	0,35	1,389	225	46,6
Хлорбензол	0,30	0,80	1,525	280	132
Бензол	0,32	0,65	1,501	280	80,1
Бромистый этил	0,37	0,41	1,424	225	38,4
Этиловый эфир	0,38	0,23	1,353	220	34,6
Хлороформ	0,40	0,57	1,443	245	61,2
Хлористый метилен	0,42	0,44	1,424	245	41
Тетрагидрофуран	0,45	0,55	1,408	220	65
Дихлорэтилен	0,49	0,79	1,445	230	84
Метилэтилкетон	0,51	0,43	1,381	330	79,6
Ацетон	0,56	0,32	1,359	330	56,2
Диоксан	0,56	1,54	1,422	220	104
Этилацетат	0,58	0,45	1,370	260	77,1
Метилацетат	0,60	0,37	1,362	260	57
Амиловый спирт	0,61	4,1	1,410	210	137,3
Диметилсульфоксид	0,62	2,24	1,478	270	190
Анилин	0,62	4,4	1,586	325	184
Нитрометан	0,64	0,67	1,394	380	100,8
Ацетонитрил	0,65	0,37	1,344	210	80,1
Пиридин	0,71	0,94	1,510	305	115,5
Изопропиловый спирт	0,82	2,3	1,38	210	82,4
Этиловый спирт	0,88	1,20	1,361	210	78,5
Метиловый спирт	0,95	0,60	1,329	210	65,0
Этиленгликоль	1,11	19,9	1,427	210	198
Уксусная кислота	Большая	1,26	1,372	251	118,5

Элюотропный ряд для графитированной сажи

вода < метанол < этанол < ацетон < пропанол

этиловый эфир < бутанол < этилацетат < *n*-гексан < бензол

На практике, чтобы выбрать требуемый элюент, лучше всего провести пробное хроматографирование в тонком слое на покровных стеклах для микроскопа. Два покровных стекла, соединенные плоскостями, опускают в суспензию адсорбента, например силикагеля, в смеси метанола с хлороформом. Стекла разделяют, дают им высохнуть, затем на них наносят 2 мкл 1%-ного раствора образца и проявляют растворителем с низкой элюирующей силой. Для этого обычно достаточно 2–3 мин. После чего пластинки сушат и, помещая их в камеру с парами иода, выявляют хроматограмму. Эксперимент повторяют, используя растворители со все возрастающей элюирующей силой, применяя, если необходимо, бинарные смеси до тех пор, пока значения R_F для представляющих интерес компонентов не будут равны 0,3 – 0,8.

Помимо того, что подвижная фаза должна иметь соответствующую элюирующую силу, при выборе ее следует учитывать следующие факторы: а) летучесть, б) метод детектирования растворенного вещества, в) вязкость, г) расслаивание растворителя, д) растворимость растворенного вещества и е) действие на адсорбент.

В ТСХ подвижная фаза должна быть достаточно летуча, чтобы после ее удаления с адсорбента можно было детектировать разделенные растворенные вещества на занятых ими местах. Это особенно важно, если подвижная фаза реагирует с выявляющим агентом. Например, большинство органических веществ реагирует с реактивами двухромовой кислоты. В случае высококипящих полярных подвижных фаз для удаления последних следов элюента может потребоваться длительное нагревание пластинок в печи. Подвижная фаза также должна быть свободна от нелетучих загрязнений в тех случаях, когда требуется выделить разделенное вещество. Удаление больших количеств высококипящего растворителя может привести к существенной потере или разложению растворенного вещества.

В хроматографии в колонках выбор подвижной фазы определяется также типом применяемого детектора. Например, в случае транспортно-ионизационного детектора разделенное вещество должно быть освобождено от подвижной фазы путем испарения последней до того, как вещество попадет в детектор. Если используется ультрафиолетовый спектрофотометр, то подвижная фаза не должна поглощать в том диапазоне длин волн, в котором будут измерять растворенное вещество. Наиболее ценными растворителями являются насыщенные углеводороды, галогенированные углеводороды, эфиры, ацетонитрилы и спирты. Эфиры не должны содержать перекисей и ингибиторов окисления, поэтому их следует перегонять непосредственно перед опытом, исполь-

зую только первые 75% собранного количества. Если применяются дифференциальные рефрактометры, то следует помнить, что чувствительность определения будет максимальной при максимальной разности в показателях преломления между растворителем и растворенным веществом. Как уже отмечалось в предыдущей главе, чтобы можно было достичь необходимой эффективности разделения за достаточно короткое время, вязкость растворителя должна быть минимальной. С этой точки зрения наиболее подходящими растворителями являются *n*-пентан, сероуглерод, 1- и 2-хлорпропан, диэтиловый эфир, ацетон, ацетонитрил и метанол.

При использовании бинарных или более сложных смесей растворителей часто происходит расслоение, что особенно легко наблюдать в ТСХ. Обычно в результате предпочтительной адсорбции наиболее сильного растворителя передний фронт подвижной фазы обогащается наименее полярным компонентом. Такое расслоение обычно нежелательно, поскольку некоторые компоненты могут перемешаться неразрешенными со вторым фронтом растворителя. Расслоение, вероятно, должно происходить в тех случаях, когда смешиваются растворители с очень различной полярностью, например хлороформ и метанол. Поэтому, если необходимо использовать бинарные смеси, лучше смешивать два растворителя с близкими полярностями. Например, 5%-ный диэтиловый эфир в гептане — отличная подвижная фаза для разделения на окиси алюминия полиядерных ароматических соединений. В то же время 1%-ный раствор этанола в гептане, несмотря на близкую элюирующую способность компонентов, нельзя считать хорошей подвижной фазой для этого разделения, поскольку происходит расслоение.

Растворитель должен растворять разделяемые вещества при рабочей температуре разделения. Этого обычно можно достичь даже в трудных случаях, подбирая подходящие смеси растворителей с требуемой элюирующей способностью. Например, для хроматографии вещества, содержащего длинную углеводородную цепь, прикрепленную к сильно полярной группе, можно использовать систему растворителей, содержащую, во-первых, углеводород (скажем, толуол), обеспечивающий необходимую растворяющую способность, во-вторых, аммиак, позволяющий добиться требуемой элюирующей способности, и, в-третьих, изопропанол, являющийся "связующим" растворителем, обеспечивающим гомогенность подвижной фазы.

Если используются дезактивированные адсорбенты, следует заботиться о том, чтобы подвижная фаза не реактивировала адсорбент. Смешивающиеся с водой растворители, в частности спирты, будут десорбировать адсорбированную на поверхности воду; правда, даже такие слабые растворители, как пентан, постепенно реактивируют окись магния, силикагель и окись алюминия. Чтобы предотвратить реакти-

вазию, в элюент следует добавлять небольшие количества воды, обычно 0,1% или меньше. Регулярно проводимая стандартизация колонки описанным выше методом, будет определять, следует ли увеличить или уменьшить содержание воды в элюенте.

Чтобы получить необходимую концентрацию воды в элюенте из водорастворимых растворителей, достаточно просто добавить требуемое количество воды или растворителя. В случае не смешивающихся с водой растворителей, таких, как пентан, простого встряхивания с водой недостаточно, так как растворение ее происходит очень медленно и в растворителе образуются капельки воды. Целесообразнее всего пропускать растворитель через колонку (100 x 4 см), заполненную пропитанной водой (~ 30%) силикагелем.

3.5. ЗАВИСИМОСТЬ АДСОРБЦИОННОГО КОЭФФИЦИЕНТА K^0 ОТ СТРУКТУРЫ РАСТВОРЕННОГО ВЕЩЕСТВА

Наиболее важным параметром, влияющим на значение K^0 , является молекулярная структура растворенного вещества. Эта зависимость K^0 от молекулярной структуры вещества в уравнении (3.1) описывается величиной S^0 , энергией адсорбции растворенного вещества. Она приблизительно равна сумме энергий адсорбции Q_i^0 отдельных функциональных групп в молекуле /2/.

Энергии адсорбции отдельных групп были определены для ряда функциональных групп на различных адсорбентах. В табл. 3.5 приведены данные, полученные для адсорбции на окиси алюминия и силикагеле; величины Q^0 для флорисила обычно идентичны значениям для силикагеля. Чем выше значение энергии адсорбции данной группы, тем сильнее молекула адсорбируется. Из-за низкого значения энергии адсорбции метиленовой группы члены гомологических рядов имеют приблизительно одинаковые энергии адсорбции. Поэтому в адсорбционной хроматографии в отличие от распределительной соединения разделяются в основном по типу, а не по молекулярному весу. Значение энергии адсорбции групп может измениться в результате внутримолекулярных электронных взаимодействий, стерических эффектов (например, плоские молекулы адсорбируются лучше, чем неплоские, *транс*-изомеры лучше, чем *цис*; *орто*-замещенные ароматические соединения адсорбируются менее сильно, чем *мета*- или *пара*-производные) и химических взаимодействий между соседними функциональными группами. Например, водородная связь уменьшает энергию адсорбции. Для детального ознакомления с влиянием структуры вещества на значения K^0 рекомендуется обратиться к работе /2/.

Таблица 3.5

Энергии адсорбции Q^0 различных групп образца [8]

Группа	Оксид алюминия			Двуокись кремния			Флорисил ^б		
	X, Y=Ar	X = R ^а , Y = Ar	X, Y=R	X, Y=Ar	X = R, Y = Ar	X, Y=R	X, Y=Ar	X = R, Y = Ar	X, Y = R
X-CH ₃	0,06	-	-0,03	0,11	-	0,07	0,10	-	-0,01
X-CH ₂ -Y	0,12	0,07	0,02	0,07	0,01	-0,05	0,19	0,10	0,01
X-Cl	0,20	-	1,82	-0,20	-	1,32	-0,20	-	1,74
X-F	0,11	-	1,64	-0,15	-	1,30	-0,15	-	1,54
X-Br	0,33	-	2,00	-0,17	-	1,32	-0,17	-	1,94
X-I	0,51	-	2,00	-0,15	-	1,28	-0,15	-	1,94
X-SH	8,70	-	2,80	-0,67	-	1,70	0,67	-	1,70
X-S-S-Y	?	~1,1	2,70	?	0,94	1,90	?	0,94	1,90
X-S-Y	0,76	1,32	2,65	0,48	1,29	2,94	?	1,30	2,94
X-O-Y	1,04	1,77	3,50	0,87	1,83	3,61	0,87	1,81	3,61
X-N-Y	?	2,48	4,40	?	2,52	5,8	?	?	?
X-CHO	3,35	-	4,73	3,48	-	4,97	3,35	-	4,97
X-NO ₂	2,75	-	5,40	2,77	-	5,71	3,07	-	5,71
X-C≡N	3,25	-	5,00	3,33	-	5,27	3,33	-	5,27
X-CO ₂ -Y	4,02	3,40	5,00	4,18	3,45	5,27	4,18	3,45	5,27
X-CO-Y	4,36	3,74	5,00	4,56	4,69	5,27	4,56	4,32	5,27
X-OH	7,40	-	6,50	4,20	-	5,60	4,20	-	5,60
X-C≡N-Y	4,14	4,46	6,00	?	?	?	?	?	?
X-NH ₂	4,41	-	6,24	5,10	-	8,00	?	?	?
X-SO-Y	?	4,0	6,70	?	4,2	7,2	?	4,2	7,2
X-COOH	19	-	21	6,1	-	7,6	6,1	-	7,6
X-CONH ₂	6,2	-	8,9	6,6	-	9,6	6,6	-	9,6
C=(ароматический углерод)	0,31	0,31	0,31	0,25	0,25	0,25	0,18	0,18	0,18

^а R - алифатический радикал.^б При условии, что $\alpha = 1,00$ для системы 1% H₂O - флорисил.

3.6. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ АДсорбЕНТЫ*

3.6.1. СИЛИКАГЕЛЬ

Адсорбенты общей формулы SiO₂ · xH₂O выше именовались как двуокись кремния, силикагель или кремневая кислота. Силикагель

* В недавно опубликованном справочнике А.А. Лурье подробно рассматриваются свойства многих адсорбентов и носителей. См. Лурье А.А., Сорбенты и хроматографические носители, изд-во "Химия", М., 1972. - Прим. перев.

в настоящее время является, вероятно, наиболее часто используемым в хроматографии адсорбентом, так как он обладает высокой емкостью, инертен по отношению к наиболее неустойчивым растворенным веществам и вполне доступен. Именно поэтому вопросу применения силикагеля в качестве хроматографического адсорбента посвящено много работ. К сожалению, силикагели, полученные разными фирмами, значительно отличаются по свойствам, в частности имеют различные значения рН поверхности, распределение пор по размерам и удельную поверхность.

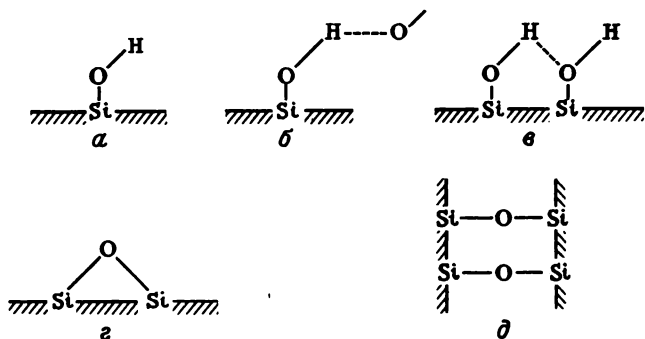
Двуокись кремния обычно готовят или осаждением кислотой из растворов солей кремневой кислоты, в частности силиката натрия, или гидролизом соединений кремния, таких, как четыреххлористый кремний, в жидкой или паровой фазе. Размер пор, удельная поверхность и природа поверхности меняются в соответствии с методом приготовления. Например, изменение рН раствора в период образования геля из силиката натрия позволяет получать силикагели с удельной поверхностью от 200 ($\text{pH} \sim 10$) до $800 \text{ м}^2 \text{ г}^{-1}$ ($\text{pH} \leq 4$). Большинство хроматографических силикагелей, в частности используемые для ТСХ, имеют удельную поверхность $30\text{--}600 \text{ м}^2 \text{ г}^{-1}$, поры диаметром $100\text{--}250 \text{ \AA}$ и классифицируются как крупнопористые силикагели. Они обладают полукристаллической структурой и относительно однородной поверхностью, покрытой преимущественно свободными гидроксильными группами (4–5 гидроксильных групп на 100 \AA поверхности). В настоящее время в продаже имеется ряд тонкопористых силикагелей со средним диаметром пор меньше 100 \AA и удельной поверхностью больше $500 \text{ м}^2 \text{ г}^{-1}$. Они обладают нерегулярной аморфной структурой, и на их поверхности содержатся преимущественно реакционноспособные и связанные гидроксильные группы (см. далее). Доступны также наборы силикагелей с порами контролируемых размеров в пределах от 100 до 2500 \AA ; их удобно применять для разделения полимеров методом ситовой хроматографии. О таких силикагелях подробно говорится в гл. 5.

Как уже указывалось, поверхность силикагеля, который не нагревали в течение длительного времени при температуре выше 400°C , покрыта в большей или меньшей степени гидроксильными группами, и именно присутствием этих поверхностных гидроксильных групп можно объяснить его селективные адсорбционные свойства. Таким образом, силикагель адсорбирует ненасыщенные, ароматические или полярные молекулы благодаря образованию водородных связей, причем растворенное вещество выступает в качестве донора электронов. На силикагеле двойные связи углерод–углерод вносят несколько меньший вклад в энергию адсорбции образца, чем на других полярных адсорбентах. Поэтому ароматические углеводороды и соединения, отличающиеся только по относительной степени ненасыщенности, луч-

ше разделяются на других полярных адсорбентах, например окиси алюминия.

Поверхность силикагеля обладает слабыми кислотными свойствами ($\text{pH } 3\text{--}5$), и, как следствие, соединения основного характера ($\text{pK}_B < 5$) адсорбируются на ней лучше, чем на нейтральных или основных адсорбентах. Иногда поверхность силикагеля бывает сильно кислой. Наблюдается это в тех случаях, когда она загрязнена кислотами, использованными при получении геля. Такие силикагели следует очистить повторным промыванием дистиллированной водой, иначе возможна хемосорбция оснований или взаимодействие с растворенными веществами, чувствительными к кислотам.

Природа поверхности силикагеля была изучена и рассмотрена рядом исследователей (см., например, работу [35]). До сих пор не существует единого мнения о влиянии обработки силикагеля на структуру его поверхности и хроматографические свойства. Однако благодаря усилиям Снайдера и сотр. [2] многие противоречия были устранены. Очень упрощенное резюме их выводов приведено ниже.



Р и с. 3.6. Природа поверхности двуокиси кремния [2].

а – свободный гидроксил; *б* – связанный гидроксил; *в* – связанный и реакционноспособный гидроксил; *г* – поверхностный силоксан; *д* – конденсированные силоксановые поверхности.

Поверхность высушенного на воздухе силикагеля, который не подвергался предварительной обработке нагреванием, содержит физически адсорбированную воду. В результате нагревания при температуре $150\text{--}200^\circ\text{C}$ удаляется большая часть адсорбированной воды и на поверхности остаются гидроксильные группы, которые, как показано на рис. 3.6, можно разделить на три типа. На поверхности крупнопористых силикагелей содержатся преимущественно свободные гидро-

кисильные группы (рис. 3.6, а), тогда как на поверхности тонкопористых силикагелей содержатся реакционноспособные (рис. 3.6, в) и связанные (рис. 3.6, б, в) гидроксильные группы. Активность различных типов центров возрастает в следующем порядке: связанные свободные < реакционноспособные гидроксильные группы. Это означает, что поверхность тонкопористых силикагелей более активна, чем поверхность крупнопористых, поскольку в первых концентрация реакционноспособных гидроксильных групп выше. Однако при добавлении воды к силикагелю с активированной поверхностью должны дезактивироваться в первую очередь реакционноспособные гидроксильные группы тонкопористого силикагеля, и на поверхности при этом остаются связанные группы. В результате соответствующей обработки крупнопористого силикагеля на его поверхности остаются свободные гидроксильные группы. Следовательно, активность поверхности сильно дезактивированного тонкопористого силикагеля меньше, чем активность таким же образом дезактивированного крупнопористого силикагеля. Влияние дезактивации водой на линейную емкость силикагелей этих типов уже обсуждалась (см. рис. 3.4).

Для того, чтобы классифицировать типы структуры поверхности силикагеля, необходимо знать отношение числа реакционноспособных гидроксильных групп к их общему числу (S_r/S_t) и площадь поверхности. Метод их определения был предложен Снайдером и Уардом (см. работу /2/). Содержание реакционноспособных гидроксильных групп определяется селективной силанизацией триметилхлорсиланом, а общее число гидроксильных групп — полной силанизацией гексаметилдисилазаном. Удельную поверхность силикагеля можно вычислить, используя экспериментально найденное значение S_t . Приведенные в табл. 3.6 данные показывают различия в свойствах тонко- и крупнопористых силикагелей.

Если активированные силикагели нагреваются при 200–400°C, реакционноспособные гидроксильные группы конденсируются, освобождая воду и образуя поверхностные силоксановые группы (рис. 3.6, г). Аналогично свободные гидроксильные группы, мигрируя относительно поверхности, создают переходные реакционноспособные комплексы, которые затем разлагаются с образованием поверхностных силоксановых групп. Регидратация таких силоксановых групп затруднена и требует длительного нагревания при 95°C с водой. Нагревание силикагелей при температурах выше 400°C вызывает "конденсацию соседних поверхностей" (рис. 3.6, д), результатом чего является уменьшение величины поверхности и потеря селективности.

Из сказанного выше следует, что хроматографические свойства силикагеля изменяются в широких пределах в зависимости от метода его получения и последующей термической обработки. Поэтому, чтобы получить воспроизводимые результаты, необходимо знать диа-

метр пор и свойства поверхности. Это позволит, во-первых, гарантировать, что используются адсорбенты одинаковой селективности, и, во-вторых, установить, какая дальнейшая обработка необходима для получения стандартного образца с оптимальной линейной емкостью.

Таблица 3.6

Различия в свойствах тонкопористых
и крупнопористых силикагелей [2]

Характеристики	Силикагель	
	тонкопористый	крупнопористый
Средний диаметр пор, Å	< 1000	> 150
Удельная поверхность, $\text{м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$	> 500	< 600
Структура поверхности	Нерегулярная, аморфная, неоднородная	Полукристаллическая, однородная
Тип гидроксильных групп	Реакционноспособные и связанные	Свободные
Поверхностная активность α		
активированный силикагель	> 1,00	< 0,9
деактивированный силикагель ^a	- 0,6	- 0,7
Изменение α при увеличении температуры активации (150–400°C)	Уменьшается	Меняется незначительно
Линейная емкость, $\text{г} \cdot \text{г}^{-1}$		
активированный силикагель	10^{-4}	$2 \cdot 10^{-4}$
деактивированный силикагель	$25 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$

^a Водой заполнено 60% поверхности (2,1% воды при $100 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$).

3.6.2. Окись алюминия

Окись алюминия в настоящее время легко доступна и после силикагеля является наиболее популярным адсорбентом. Как и силикагель, это полярный адсорбент, и порядок элюирования растворенных веществ на этих двух адсорбентах в общем одинаков. С практической

точки зрения имеются три важных отличия окиси алюминия от силикагеля:

а. Энергия адсорбции молекул, содержащих изолированные и сопряженные двойные связи, на окиси алюминия выше. Поэтому диапазон величин адсорбционных коэффициентов таких веществ на ней шире и она больше, чем силикагель, подходит для разделения смесей ароматических углеводородов.

б. Окись алюминия содержит ряд сильно основных центров и поэтому предпочтительно адсорбирует соединения кислотного характера. Сильные кислоты ($pK_a \leq 5$) хемосорбируются на окиси алюминия, а более слабые могут быть разделены в соответствии с их значениями pK_a , особенно если использовать основные элюенты.

в. Активированную окись алюминия нельзя использовать для некоторых разделений потому, что ряд веществ претерпевает химические превращения на реакционноспособных центрах /9/. Примерами могут служить: образование солей с кислотами, омыление эфиров и ангидридов, реакции конденсации с альдегидами и кетонами, реакции отщепления с потерей галогеноводородов, изомеризация и полимеризация олефинов, реакции окисления и образование комплексов.

Окись алюминия имеет несколько кристаллических форм в зависимости от метода получения и термической обработки. Используемая в хроматографии окись алюминия в основном содержит γ -форму и небольшие количества других кристаллических форм, например η , χ , ρ . Все эти формы имеют близкие хроматографические свойства. При нагревании до $900-1000^\circ\text{C}$ они переходят в другие кристаллические модификации /1/ (θ, δ, K). При нагревании до температур выше 1100°C все модификации окиси алюминия переходят в α -форму которая хроматографически инертна, вероятно, из-за ее малой удельной поверхности и иной структуры решетки. Идеальный кристалл γ -окиси алюминия состоит из рядов больших окисных ионов (O^{2-}) и маленьких ионов алюминия (Al^{3+}), занимающих три из каждых четырех полостей между окисными ионами. При комнатной температуре вода легко адсорбируется на поверхности окиси алюминия вплоть до образования монослоя; причем каждая молекула воды связывается с двумя поверхностными окисными ионами. При нагревании гидратированной окиси алюминия до $300-400^\circ\text{C}$ большая часть адсорбированной воды удаляется. Остается вода, реагирующая с поверхностью с образованием гидроксильных групп; причем на 100 \AA поверхности образуется до шести гидроксильных групп. Это и есть та форма окиси алюминия, которую обычно используют в хроматографии. При добавлении воды в количествах, соответствующих 50%-ному заполнению монослоя, линейная емкость увеличивается. Однако многие исследователи дезактивировали свои адсорбенты большими количествами воды.

Авторы работы /10/ показали, что, кроме обычных макропор внутри частиц, образующих гранулы, и пор между этими частицами, имеется система цилиндрических пор правильной формы диаметром 27 Å, расположенных гексагонально. Удельная поверхность типичной хроматографической окиси алюминия обычно составляет $100-200 \text{ м}^2 \text{ г}^{-1}$

Относительно природы активных центров и соответствующих адсорбционных взаимодействий на поверхности окиси алюминия были сделаны различные предположения. При нагревании гидратированной окиси алюминия выше 400°C гидроксильные группы постепенно удаляются, но поверхностные гидроксильные группы не исчезают полностью даже при нагревании под вакуумом при $800-1000^\circ\text{C}$. Тем не менее хроматографическая активность с увеличением температуры активации вплоть до 1100°C возрастает. Это считается доказательством того, что поверхностные гидроксильные группы в адсорбции на окиси алюминия важной роли не играют; в случае силикагеля наблюдается обратное. Снайдер /2/ различает три типа адсорбционных центров:

а. Кислотные, или электрофильные, центры, взаимодействующие с растворенными веществами, содержащими области с высокой электронной плотностью. Это наиболее часто наблюдаемый механизм адсорбции, показывающий, что поверхность окиси алюминия по отношению к большинству типов растворенных веществ обладает кислотными свойствами.

б. Основные, или нуклеофильные, центры (вероятно, окисные ионы), ответственные за предпочтительную по сравнению с другими адсорбентами адсорбцию кислот на окиси алюминия.

в. Электроноакцепторные центры, образующие комплексы с легко поляризуемыми ароматическими молекулами, такими, как нафталин. Точная природа этих центров еще не известна.

3.6.3. Силикаты магния

Эти адсорбенты являются продуктами соосаждения двуокиси кремния и окиси магния. Широко распространенным адсорбентом такого рода является флорисил (Floridin Co., Pittsburg, Co.) — белый материал, содержащий 84% двуокиси кремния. Его хроматографические свойства и примеры использования рассматриваются в работах /11, 12/. Этот продукт имеет средний диаметр пор 62 Å и удельную поверхность $300 \text{ м}^2 \text{ г}^{-1}$. Активированный флорисил, полученный при нагревании до 400°C в течение 16 ч, обладает сильными кислотными центрами и, помимо хемосорбции органических азотистых оснований, адсорбирует также избирательно, но необратимо соединения других типов, например эфиры и ароматические углеводороды. При дезактивации добавлением до 1% воды последняя предпочтительно блокирует кислотные центры. В результате дальнейшей дезактивации получают

адсорбент, который по хроматографическим свойствам занимает промежуточное положение между двуокисью кремния и окисью алюминия.

3.6.4. Окись магния

Магнезия (гидроокись или окись магния) – полярный адсорбент основного характера был исследован Снайдером /13/. Окись магния получают в виде очень тонкого белого порошка, пригодного и для ТСХ и для высокоэффективной хроматографии в колонке. Полагают, что поверхностные гидроксильные группы играют важную роль в механизме адсорбции. При нагревании до 150°C гидроокись магния теряет различные количества физически адсорбированной воды. При нагревании до 350°C активность гидроокиси магния резко возрастает вследствие потери гидроксильных и образования окисных групп. При дальнейшем нагревании активность адсорбента уменьшается, и, если температура нагревания превышает 1000°C, он становится совершенно инертным. Активированная окись магния хемосорбирует ароматические соединения. Чтобы избежать этого, адсорбент активируют при 500°C в течение 16 ч, а после этого дезактивируют 3–7% воды. Линейная емкость системы 3% H_2O – MgO равна примерно $2 \cdot 10^{-5}$ г/г –1 /13/.

Дезактивированная окись магния легко реактивируется при обработке "сухими" растворителями, такими, как пентан. Поэтому, чтобы предотвратить хемосорбцию, следует всегда использовать насыщенные водой растворители. Селективность дезактивированной водой магнезии аналогична селективности силикагеля или окиси алюминия. Однако соединения, содержащие ненасыщенные связи углерод—углерод, удерживаются на магнезии значительно более сильно, чем на окиси алюминия. Поэтому магнезия является ценным адсорбентом, применяемым для разделения соединений, отличающихся только по степени ненасыщенности, например олефинов и диолефинов, полиядерных ароматических соединений и т.д. В связи с высоким значением рН поверхности на магнезии хемосорбируются кислоты.

3.6.5. Модифицированные адсорбенты

Свойства силикагеля и других полярных адсорбентов могут быть модифицированы посредством включения в них комплексообразующих агентов. Например, отделение олефиновых углеводородов от насыщенных происходит много лучше, если силикагель сначала пропитывают раствором нитрата серебра. В табл. 3.7 приведены некоторые из используемых модификаторов. Обычно адсорбент смешивают с 1–10%-ным раствором комплексообразующего агента в воде или ацетоне. Полученную пасту или непосредственно наносят на пластинки обычным способом, или высушивают при 110°C в печи и загружают в колонку.

Таблица 3.7

Модифицированные адсорбенты

Комплексообразующий агент	Типы соединений, удерживаемые селективно	Литература
0,1–0,5 н. кислоты или основания	Соединения, чувствительные к изменению pH	14
Нитрат серебра	Олефины или ацетилены	15–17
Борная кислота, борат натрия, арсенит натрия, метаванадат натрия, молибдат натрия	Полигидроксильные соединения	18
Кофеин, 2,4,7-тринитрофлуоран, пикриновая кислота, тринитробензол	Полиядерные ароматические углеводороды	19–22
Бисульфит натрия	Альдегиды	23
Хлорное железо	Оксины	24
Сульфат меди	Амины	25
Ферроцианид цинка	Сульфамиды	26

3.6.6. Поверхностно-пористые носители

В настоящее время в высокоэффективных колонках применяются жесткие непористые носители, например стеклянные шарики, покрытые тонким пористым слоем адсорбента (на который может быть нанесена жидкая неподвижная фаза, см. гл. 4). Вероятно, уже к моменту опубликования этой книги в продаже будет значительно больший набор материалов, чем приведен в табл. 3.2.

Жесткие носители оказывают малое сопротивление потоку и имеют регулярные размеры, что позволяет легко заполнять колонки сухим методом, причем эффективность их составляет примерно 5000 гарелок на метр. Указанные материалы выдерживают давление по меньшей мере до 500 атм. Это позволяет получать колонки, с которыми можно оперировать при высоких скоростях потока. Для таких колонок характерно малое влияние скорости подвижной фазы на ВЭТТ (см. рис. 4.6). Следовательно, на них можно проводить анализы при высоких скоростях потока, значительно сокращая длительность анализа почти без снижения эффективности.

Хорват и др. /27, 28/ покрывали стеклянные шарики тонкой оболочкой ионообменной смолы, проводя непосредственно на шариках сополимеризацию стирола с дивинилбензолом и последующее химическое превращение в подходящую ионную форму.

Кирклэнд /29, 30/ ввел носители с контролируемой поверхностной пористостью, которые состоят из стеклянных шариков с порис-

той поверхностью контролируемой толщины и размерами пор (зипакс). Носители этого типа со средним диаметром пор примерно 1000 \AA имеют величину поверхности $0,65 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$. Это очень слабые адсорбенты с низкой емкостью, и поэтому они более пригодны в качестве носителей в распределительной хроматографии (см. гл. 4). Получены также насадки с катионообменными свойствами, в которых пористый слой состоит из фторполимера, содержащего свободные сульфогруппы. Насадку можно использовать при высоких температурах с различными подвижными фазами, она может выдерживать давления на входе в колонку больше 200 атм. Ионообменная емкость составляет $3,5 \text{ мкг экв} \cdot \text{г}^{-1}$. Аналогичным образом была приготовлена сильно основная анионообменная насадка с контролируемой поверхностной пористостью, содержащая тетраалкиламмониевые группы. Емкость этой насадки составляла $12 \text{ мкг-экв} \cdot \text{г}^{-1}$.

Адсорбент корасил (фирма "Waters Associates") – стеклянные шарики, покрытые одинарным или двойным слоем пористой двуокиси кремния (корасил I и II соответственно). Перед употреблением его активируют, нагревая при 110°C примерно 12 ч, а затем дезактивируют, добавляя 0,5% воды. При нагревании выше 300°C происходит непрерывное уменьшение поверхностной активности. Линейная емкость корасила II (удельная поверхность $14 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$) на порядок меньше, чем линейная емкость обычного силикагеля. О свойствах этих насадок говорят результаты высокоскоростного анализа фенольных и аминных антиоксидантов, рассматриваемого в работе /31/.

3.6.7. Углеродные адсорбенты

Углеродные адсорбенты обладают отличными адсорбционными свойствами, но из-за их недостаточно определенных свойств и цвета, который затрудняет визуальное детектирование полос растворенных веществ, они до сих пор ограниченно используются в адсорбционной хроматографии. Углеродные адсорбенты хорошо адсорбируют ароматические и высокомолекулярные соединения, и поэтому их используют в качестве "осветляющих" агентов, например для удаления высокомолекулярных соединений из сложных смесей с целью упрощения последующего анализа низкомолекулярных материалов. Примером является удаление высокомолекулярных углеводных материалов из растительных остатков при исследовании инсектицидов.

Цвет углеродного адсорбента почти полностью исключает его использование в ТСХ из-за трудности детектирования. Однако использование колонок и систем детектирования, описываемых в этой книге, предполагает переоценку возможности использования определенных форм активированных углеродных адсорбентов. Оценка предыдущих опубликованных работ, в которых в качестве адсорбента использовался активный уголь, часто затруднена из-за плохого определе-

ния природы использованного угля. Однако в настоящее время природа поверхности углеродного адсорбента изучена достаточно полно (последние обзоры приведены в списке дополнительной литературы), и теперь доступны углеродные адсорбенты с более точно определенными свойствами. К числу таких адсорбентов относятся графон (Graphon), полностью неполярный углеродный адсорбент с гидрофобной поверхностью, и более полярный адсорбент сферон-6 (Spheron 6); их выпускает фирма "Cabot Corporation". Активированные углеродные адсорбенты отличаются от окисей металлов именно тем, что они неполярны и гидрофобны, и это делает их особенно ценными адсорбентами.

Углерод встречается в природе в двух аллотропных формах — алмаза (который нас не интересует) и графита. Графит является хорошо определенной кристаллической формой элементарного углерода, в которой отстоящие друг от друга на 3,35 Å слои атомов углерода связаны ковалентными sp^2 -связями в систему гексагональных конденсированных колец. Слои удерживаются вместе относительно слабыми силами Ван-дер-Ваальса.

Углеродные адсорбенты можно разделить на два главных типа — активный уголь и сажу. Активные угли готовят деструктивной перегонкой органических материалов, таких, как дерево или кость. Активация достигается медленным окислением при повышенных температурах воздухом, паром, двуокисью углерода или хлором или пропитыванием солями, кислотами или щелочами и последующим прокаливанием. Полученные таким образом угли имеют гетерогенные поверхности, содержащие, кроме органических функциональных групп, неорганические атомы, что затрудняет (или вообще делает невозможным) интерпретацию данных об адсорбции. Поэтому адсорбционные свойства углей, полученных из различных материалов, отличаются; свойства угля одной марки могут меняться от партии к партии.

Сажи образуются при неполном сжигании углеводородов. Они являются микрокристаллическими материалами; образующие их графитоподобные слои, отстоящие друг от друга на 3,6 Å, "собраны в пакеты" из 3–30 слоев толщиной примерно 10–100 Å. Однако слои часто содержат тетраэдрически связанные атомы углерода, в результате чего образуются поперечные связи, являющиеся причиной дефектов решетки. Ненасыщенные связи на гранях плоскостей графитовых слоев высокореакционноспособны и в процессе производства реагируют с примесными атомами или группами. Например, при низкотемпературном окислении углеродные адсорбенты обычно образуют поверхности, содержащие кислотные окислы, что обусловлено наличием карбоксильных, карбонильных и фенольных групп. Обнаружены были также группы основного характера.

Обычно поверхность сажи гидрофобная, неполярная и проявляет плохую специфичность по отношению к функциональным группам. Однако вследствие наличия неорганических веществ и полярных функциональных групп поверхность содержит также гидрофильные центры. Именно поэтому многие сажи обладают адсорбционными свойствами, напоминающими свойства окислов металлов. Адсорбция на таких центрах является результатом действия электростатических сил и водородных связей. Подобные углеродные адсорбенты проявляют также ионообменные свойства; например, они адсорбируют определенные органические соли с освобождением кислот или оснований.

Если сажи типа сферона-6 нагревают до 3000°C в инертной атмосфере, они теряют гидрофильные функциональные группы, в то время как плоские слои графита в этих условиях перегруппировываются и образуют более кристаллический материал. Поверхность у этого материала имеет более гидрофобный неполярный характер, а селективность по отношению к функциональным группам отсутствует. В отличие от окислов металлов главный вклад в энергию адсорбции растворенных веществ на таких материалах (графон) составляют дисперсионные силы.

Различие в свойствах сферона-6 и графона было продемонстрировано рядом исследователей. На более полярном сфероне-6 метанол адсорбируется сильнее, чем бензол, тогда как в случае графона справедливо обратное. На сфероне-6 адсорбция обусловлена образованием водородной связи между полярной группой адсорбента и гидроксильной группой растворенного вещества, причем углеводородная цепь спирта располагается вертикально по направлению к раствору. На графоне молекула спирта располагается параллельно поверхности адсорбента. Установлено, что алифатические кислоты адсорбируются на графоне в виде димеров и что длинные оси направлены параллельно поверхности адсорбента. Аналогичная ориентация наблюдается и в случае адсорбции алкилбензолов и метиловых эфиров монокарбоновых кислот.

Многие выпускаемые промышленностью углеродные адсорбенты имеют промежуточные свойства, т.е. на их поверхности имеются кислородсодержащие группы и в то же время их поверхность имеет структуру графита. Адсорбционные свойства окисленных углеродных адсорбентов напоминают свойства окислов металлов, но благодаря графитовой структуре ароматические соединения адсорбируются сильнее, чем соответствующие алифатические производные. В результате элюотропные ряды, полученные на рассматриваемых адсорбентах, отличаются от полученных на окислах металлов (см. стр. 69). Следует отметить, что элюирующая сила растворителя возрастает с увеличением размера молекулы растворителя. Ароматические растворители должны быть сильнее, чем соответствующие алифатические растворители.

Активные угли выпускают в виде сферических пористых частиц, их удельная поверхность и диаметры пор зависят от методов получения и способа активации. Как правило, можно различить три типа пор: макропоры, переходные поры и микропоры. Характеристики каждого типа пор приведены в табл. 3.8*.

Малая величина поверхности макропор говорит о том, что такие поры играют незначительную роль в адсорбции; однако они образуют транспортные каналы к более важным переходным порам и микропорам.

Таблица 3.8

Тип пор	Диаметр пор, Å	Удельная поверхность, м ² /г ⁻¹
Макропоры	2000–1 000 000	0,5–2
Переходные поры	30–2000	80–400
Микропоры	< 30	> 400

Величина поверхности и диаметр переходных пор сравнимы с соответствующими характеристиками силикагеля или окиси алюминия, и угли этого типа широко используются для удаления больших молекул или коллоидных материалов из растворов, содержащих молекулы меньших размеров, например при очистке биологических остатков. Адсорбированные молекулы образуют на поверхности монослой.

Диаметр пор микропористых активных углей имеет такой же порядок, что и поры многих органических молекул. Энергия адсорбции в микропорах относительно высока, что ведет к низким скоростям массопередачи. Это в свою очередь может быть причиной плохого разделения.

3.6.8. Ионообменные смолы

Ионообменные смолы – это природные или синтетические нерастворимые полиэлектролиты, имеющие пористую структуру; они могут поглощать положительно или отрицательно заряженные ионы из контактирующего с ними раствора электролита путем обмена их на эквивалентное количество собственных ионов, переходящих в раствор. Материалы с такими свойствами широко применяются для удаления, концентрирования, обмена или анализа неорганических ионов в вод-

* Следует заметить, что в случае микропористых адсорбентов понятие "удельная поверхность" теряет смысл (Дубинин М.М., в сб. "Основные проблемы теории физической адсорбции", изд-во "Наука", М., 1970, стр. 251). – *Прим. перев.*

ных растворах. Эти вопросы в данной книге не обсуждаются, но читатель может познакомиться с ними в работах, приведенных в списке дополнительной литературы. Нас больше интересует возможность использования ионообменных смол в качестве основных или кислотных адсорбентов в неионной органической среде /32/.

Ионообменные смолы, чаще всего используемого в настоящее время типа, имеют нерегулярную трехмерную сетчатую структуру: углеводородная матрица, несущая способные к ионизации группы. Углеводородная матрица – это сополимер стирола и дивинилбензола, в который до или после полимеризации вводят различные функциональные группы, чтобы придать смоле ионообменные свойства. Ионообменные материалы в соответствии с типом активной группы классифицируются следующим образом:

Ионообменные смолы

Катионообменные		Анионообменные		
Слабокислотные	Сильнокислотные	Слабоосновные	Среднеосновные	Сильноосновные
(карбоновая кислота)	(сульфокислота)	(первичный амин)	(вторичный или третичный амин)	(четвертичные аммонийные оснoвания)

Так называемые макросетчатые ионообменные смолы имеют жесткую макропористую структуру с диаметром пор до 800 Å, наложенную на нормальную структуру геля. Поэтому их физическая структура подобна структуре силикагеля или окиси алюминия. В то же время химически они подобны обычным сополимерам стирола и дивинилбензола, используемым главным образом в водном растворе. Макросетчатые смолы вследствие особенностей их структуры можно использовать в растворителях, в которых смолы не набухают (т.е. неполярных органических растворителях), а также для адсорбции больших органических молекул или ионов.

В настоящее время промышленность выпускает ряд макросетчатых смол. Их свойства (табл. 3.9) можно сравнить со свойствами обычной стандартной смолы. Сравним, например, амберлит А-15, сульфокатионит с удельной поверхностью $42,5 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, со стандартной смолой амберлит IR-120 с удельной поверхностью менее $0,1 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ /33/. При исследовании методом электронной микроскопии внутренней пористой структуры у обычной смолы обнаружено не было, но она была найдена у амберлита А-15, причем поры имели диаметр 400–800 Å.

Таблица 3.9

Некоторые свойства макросетчатых смол

		Амберлитовые смолы ^а					
Обозначение		A-15	XN1005	A-29	A-27	A-21	IR-120
Тип		Катионит	Катионит	Анионит	Анионит	Анионит	Катионит
Ионная форма		Водородная	Водородная	Хлор	Хлор	Свободное основание	Водородная
Активная группа		-SO ₃ H	-SO ₃ H	Четвертичное аммониевое основание	Четвертичное аммониевое основание	Третичный амин	-SO ₃ H
Емкость, мг-экв·г ⁻¹		4,9	3,5	2,7	2,6	4,8	4,5
Емкость, мг-экв·мл ⁻¹		2,9	-	1,0	0,7	1,6	1,7
Диаметр пор, Å		200-600	-	200-600	400-800	700-1200	<5
Удельная поверхность, м ² ·г ⁻¹		40-50	122	40-50	60-70	20-30	0,1

^а Фирма-изготовитель "Rohm and Haas Co., Philadelphia, Pa."

Исследования ионообменного равновесия и кинетики адсорбции показали, что макросетчатая смола должна быть намного менее чувствительна к природе растворителя, чем обычная. Макросетчатые смолы могут выдерживать попеременное смачивание и высушивание размеры частиц их не уменьшаются, т.е. эти смолы показывают лучшую физическую стабильность по сравнению с обычными смолами. Более того, они не ухудшают заметно своих свойств при многократной замене водной среды на неводную.

Ионообменные смолы в органической среде ведут себя как адсорбенты кислотного или основного характера. Как известно, на них происходит как физическая, так и химическая адсорбция. Например, на ацетатной форме амберлита А-29 происходит физическая адсорбция полярных соединений типа пиррола и фенола из растворов углеводов. Эти растворенные вещества могут быть вымыты со смолами полярными растворителями, такими, как пиридин или метанол. Кислоты на этой смоле хемосорбируются, и для их элюирования требуются кислотные растворители. В свою очередь сильнокислотный катионит амберлит А-15 хемосорбирует азотистые основания из растворов в углеводородах, а десорбировать их можно, только используя растворители основного характера. Селективность смолы можно значительно повысить, если использовать форму, в которой она будет образовывать комплекс (лиганд) с растворенным веществом [36]. Например, катиониты в Ag^+ , Cu^{2+} или Ni^{2+} формах используют для разделения аминов и карбоксильных кислот, Ag^+ -форму используют также для отделения соединений с двойными oleфиновыми связями. Элюирование проводят агентом, комплексообразующие свойства которого слабее, чем у веществ, которые надо разделить. Вытесняющее про-
вление выполняется с помощью реагента с более сильными комплексообразующими свойствами.

Список литературы

1. Giles C.H., MacEwan T.H., Nakhwa S.N., Smith D., J. Chem. Soc., **1960**, 3973.
2. Snyder L.R. Principles of Adsorption Chromatography, Dekker, New York, 1968.
3. Snyder L.R., J. Chromatog., **5**, 430 (1961).
4. Snyder L.R., Separation Sci., **1**, 191 (1966).
5. Hesse G., Roscher G., Z. Anal. Chem., **200**, 3 (1964).
6. Hagdhal L., Holman R.T., J. Am. Chem. Soc., **72**, 701 (1950).
7. Snyder L.R., Advan. Anal. Chem. Inst., **3**, 251 (1964).
8. Snyder L.R., J. Chromatog., **23**, 388 (1966).
9. Hesse G., Z. Anal. Chem., **211**, 5 (1965).
10. Bowen J.N., Bowrey R., Malin A.S., J. Catalysis, **1**, 209 (1967).
11. Snyder L.R., J. Chromatog., **12**, 488 (1963).
12. Floridin Technical Data and Product Specifications, Floridin Co., Tallahassee, Fla.
13. Snyder L.R., J. Chromatog., **28**, 300 (1967).

14. Stahl E., Dumont E., J. Chromatog. Sci., **7**, 517 (1969).
15. Urbach G., J. Chromatog., **12**, 196 (1963).
16. Gupta A.S., Dev S., J. Chromatog., **12**, 189 (1963).
17. Chapman L.R., Kuemmel D.F., Anal. Chem., **37**, 1598 (1965).
18. Morris L. J. J. Chromatog., **12**, 321 (1963).
19. Berg A., Lam J., J. Chromatog., **16**, 157 (1964).
20. Klemm L.H., Reed D., Lind C.D., J. Org. Chem., **22**, 739 (1957).
21. Harvey R.G., Halonen M., J. Chromatog., **25**, 294 (1966)†
22. Kessler H., Müller E., J. Chromatog., **24**, 469 (1966).
23. Adachi S., J. Chromatog., **17**, 295 (1965).
24. Cawthorne M.A., J. Chromatog., **25**, 164 (1966).
25. Brockmann H., Disc. Faraday Soc., **7**, 58 (1949).
26. Fogg A.G., Wood R., J. Chromatog., **20**, 613 (1965).
27. Horvath C.G., Lipsky S.R., J. Chromatog. Sci., **7**, 109 (1969).
28. Horvath C.G., Preiss B.A., Lipsky S.R., Anal. Chim., **39**, 1422 (1967).
29. Kirkland J.J., Anal. Chem., **41**, 218 (1969).
30. Kirkland J.J., J. Chromatog. Sci., **7**, 361 (1969).
31. Majors R.E., J. Chromatog. Sci., **8**, 338 (1970).
32. Webster P.V., Wilson J.N., Franks M.C., Anal. Chim. Acta, **38**, 193 (1967).
33. Kunin R., Meitzner E.F., Oline J.A., Fisher S.A., Frisch N., Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., **1**, 140 (1962).
34. Hefmann E., Chromatography, Reinhold, New York, 1967.
35. Hockey J.E., Chem. Ind. (London), **1965**, 57.
36. Helfferich F., Advan. Chromatog., **1**, 3 (1966).

Список дополнительной литературы

- Giles C.H., Easton I.A., Adsorption Chromatography, Advan. Chromatog., **3**, 70 (1966). Обсуждение вида изотерм адсорбции и природы адсорбированных сил на двуокиси кремния, окиси алюминия и углеродных адсорбентах.
- Young D.M., Crowell A.D., Physical Adsorption of Gases, Butterworths, London, 1962. Обширный обзор, в котором дается представление о природе физической адсорбции.
- Snyder L.R., Principles of Adsorption Chromatography, Dekker, New York, 1968. Подробно рассматриваются процессы разделения и основные принципы жидкостной адсорбционной хроматографии. Систематизированы данные по разделению неионных органических соединений.
- Hayward D.O., Trapnell B.M.W., Chemisorption, Butterworths, London, 1964. Обширный обзор, в котором дается представление о природе хемосорбции.
- Snyder L.R., R_F values in thin-layer chromatography on alumina and silica, Advan. Chromatog., **4**, 3 (1967). Общая теория корреляции и предсказания значений R_F в ТСХ. Справедливость теории проверена на литературных данных.
- Everett D.H., Stone F.S. (eds), The Structure and Properties of Porous Materials, Butterworths, London, 1958. Содержит главы о структурных характеристиках углеродных и кремнеземных адсорбентов.
- Hockey J.A., The surface properties of silica powders, Chem. Ind. (London), **1965**, 57; Mitchell S.A., Surface properties of amorphous silicas, Chem. Ind. (Lon-

- don), 1966, 924. Влияние различных методов приготовления и последующей термической или химической обработки на природу и свойства поверхности кремнезёмов.
- Hefmann E.*, Chromatography, Reinhold, New York, 1967. Общий обзор хроматографии.
- Coughlin R.W.*, Carbon as adsorbent and catalyst, Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., 8, 12 (1969). Влияние структуры и химии поверхности углеродных адсорбентов на их каталитические и адсорбционные свойства.
- Dubin M.M.*, in "Chemistry and Physics of Carbon", Walker P.L., ed., Dekker, New York (1966), vol. 2, p. 51. Пористая структура и адсорбционные свойства активных углей.
- Zettlemoyer A.C., Narayan K.S.*, Adsorption from solution by graphite surfaces, in "Chemistry and Physics of Carbon", Walker P.L., ed., Dekker, New York, 1966, vol. 2, p. 197. Некоторые фундаментальные исследования, включающие сравнение свойств графита и сферона 6.
- Amphlett C.B.*, Inorganic Ion Exchangers, Elsevier, London, 1964. Рассматриваются недавно разработанные неорганические ионообменники, полезные для работы при высокой температуре. Обсуждается преимущественно разделение неорганических веществ, хотя в принципе метод применим для работы в неводных средах.
- Helfferrich F.*, Inorganic Ion Exchangers, McGraw-Hill, New York, 1962. Монография, излагающая основные теоретические представления ионного обмена.
- Inczedy J.*, Analytical Applications of Ion Exchangers, Pergamon Press, Oxford, 1966; *Samuelson C.*, Ion Exchange Separations in Analytical Chemistry, Wiley New York, 1963. Книги, полезные для аналитиков-практиков; излагаются элементарная теория и основы метода ионообменной хроматографии, включая разделения органических смесей.
- Helfferrich F.*, Ion exchange chromatography, Advan. Chromatog., 1, 3 (1966). Обзор достижений ионообменной хроматографии за период 1960 — 1965 гг. Приводятся примеры разделения органических веществ в неводной среде. Описана комплексообразовательная хроматография.

ЖИДКОСТНАЯ РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. МЕХАНИЗМ ПРОЦЕССА И ИСПОЛЪЗУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1. ВВЕДЕНИЕ

Органическое растворенное вещество, находящееся в жидкой подвижной фазе, при контакте ее с органической жидкостью, адсорбированной или химически связанной с пористым носителем, распределяется между ними. Мы не будем рассматривать осложнения, возникающие при попытке классифицировать указанные системы. Например, трудно решить, к распределительным или адсорбционным системам следует относить адсорбенты, модифицированные водой. Мы можем рассматривать процессы, происходящие в таких системах, как адсорбционные хроматографические процессы на границе раздела жидкость – твердое тело.

Обсуждение термодинамических и практических аспектов жидкостной распределительной хроматографии необходимо начать с изучения простой модельной системы, представляющей собой две жидкие фазы, находящиеся в контакте. Примером такой системы может служить делительная воронка, содержащая две несмешивающиеся жидкости, например воду и гептан. Если ввести на поверхность раздела небольшое количество смеси бензола и этанола, то большая часть бензола перейдет в гептан, а большая часть этанола – в водную фазу. Уже этот простой пример позволяет поставить ряд важных вопросов. Прежде всего, что мы понимаем под несмешивающимися жидкостями? Гептан и вода взаимно растворимы, хотя и очень незначительно (растворимость гептана в воде равняется $\sim 5 \cdot 10^{-5}$ г/см³ при 15°C).

Таким образом, в условиях равновесия мы имеем дело с распределением растворенного вещества между разбавленным раствором гептана в воде и разбавленным раствором воды в гептане, причем концентрация каждого раствора меняется с изменением температуры. Поэтому при обсуждении свойств, а также при выборе подходящих "несмешивающихся" жидких фаз нам придется воспользоваться правилом фаз.

Следующая проблема, возникающая при рассмотрении нашей простой модели, касается вопросов контакта двух фаз. В приведенном примере растворенные вещества были введены на поверхность раздела, и скорость их распределения определяется скоростью диффузии с поверхности раздела в глубь контактирующих жидкостей. Равновес-

ное распределение достигается значительно скорее при энергичном встряхивании делительной воронки благодаря увеличению площади контакта в результате диспергирования одной фазы в другой. Фактически мы переходим к системе для простой периодической экстракции растворителем, постоянно используемой в лабораторной практике.

Схемой, основанной на последовательном использовании периодической экстракции растворителем в каскаде экстракторов, часто пользуются для иллюстрации принципа противоточной экстракции. Последняя применяется в промышленности для разделения, очистки и в производстве органических материалов.

Разработано довольно хорошее лабораторное оборудование для противоточной экстракции, и метод этот широко применяется, особенно в биохимии. По существу противоточное разделение – это громоздкая и неэффективная форма распределительной хроматографии. Последняя представляет собой процесс, при котором вследствие распределения неподвижной жидкости в виде тонкой пленки на поверхности инертного пористого твердого тела с очень большой удельной поверхностью достигается тесный контакт фаз.

Такое упрощенное введение позволяет выявить несколько важных моментов, практическое значение которых мы объясним в дальнейшем.

В этой главе мы рассмотрим термодинамику процесса распределения и ее связь с характеристиками хроматографического процесса, а также правило фаз и его использование при выборе двух фаз. После этого мы перейдем к сугубо практическому вопросу выбора подходящих материалов для распределительной хроматографии.

4.2. ТЕРМОДИНАМИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕЩЕСТВА МЕЖДУ ДВУМЯ ЖИДКИМИ ФАЗАМИ

4.2.1. Зависимость коэффициента распределения от свойств раствора

Успешное использование распределительной хроматографии зависит от умения выбирать пары фаз с селективностью, обеспечивающей разделение интересующих нас компонентов. В настоящее время выбор фаз требует большого искусства, поскольку из-за отсутствия достаточно развитой теории растворов наши знания о коэффициентах распределения в основном носят эмпирический характер. Поэтому следует поощрять работы, позволяющие предсказывать свойства используемых в хроматографии растворов; такие исследования открывают единственно правильный путь к полному пониманию и эффективному использованию процессов распределения в жидкостях.

В основу одной из очень упрощенных теорий положены приведенные ниже уравнения:

$$a_S / a_M = 1 \quad (4.1)$$

$$K = C_S / C_M. \quad (4.2)$$

Первое уравнение является выражением термодинамического условия равенства активностей растворенного вещества в двух контактирующих несмешивающихся фазах (a_S , a_M). Из второго уравнения следует, что коэффициент распределения растворенного вещества в данной системе равен отношению его концентраций в двух фазах. Поскольку $a_S = C_S \gamma_S$, а $a_M = C_M \gamma_M$, где γ_S и γ_M — коэффициенты активности растворенного вещества в неподвижной и подвижной фазах соответственно, то

$$\gamma_S C_S / \gamma_M C_M = 1 = K \gamma_S / \gamma_M, \text{ т.е. } K = \gamma_M / \gamma_S. \quad (4.3)$$

Иными словами, коэффициент распределения, а поэтому и объем удерживания очень просто связаны с коэффициентами активности растворенного вещества в двух фазах. В тех немногих случаях, когда коэффициенты активности имеются в литературе, объемы удерживания можно рассчитать.

Иногда можно предположить, что один из коэффициентов активности равен 1 (например, разбавленные растворы одного алкана в другом), тогда второй коэффициент активности можно рассчитать из измеренного объема удерживания.

На данной стадии развития жидкостной распределительной хроматографии в ряде случаев коэффициенты активности можно определять (что важно, в частности, для инженерных расчетов), но еще только делаются попытки использовать коэффициенты активности для предсказания возможности разделения смесей. Поэтому при выборе пар фаз для ЖРХ в основном руководствуются эмпирическими правилами.

4.3. ВЫБОР ПАРЫ ПОДВИЖНОЙ И НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗ

Рассмотрим ЖРХ-систему с точки зрения: 1) способности обеспечивать требуемое разделение (или для краткости необходимой селективности), 2) стабильности при использовании и 3) пригодности ее динамических характеристик, т.е. обеспечения максимальной разрешающей способности и удобства использования.

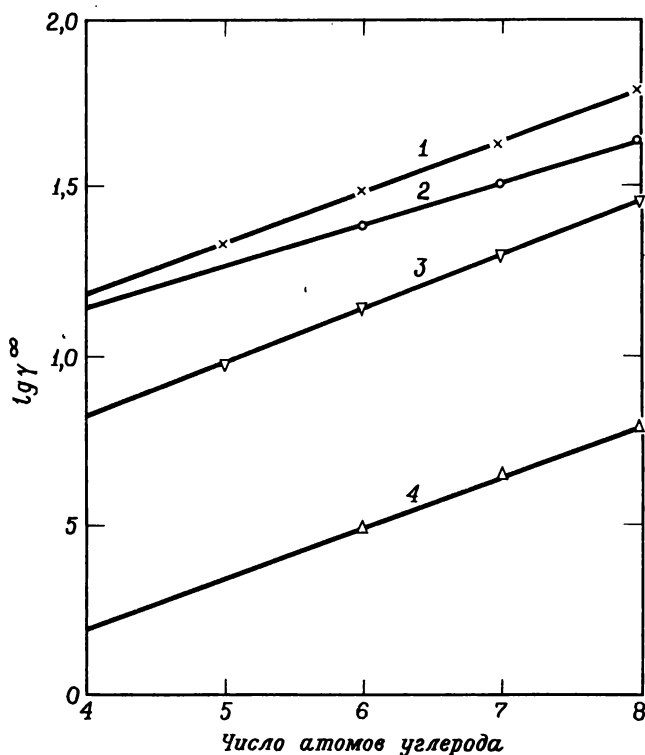
4.3.1. Селективность

Разделение веществ с помощью процессов распределения становится возможным благодаря различиям в размерах, формах и характеристиках полярности молекул.

Из уравнения (4.3) следует, что величина коэффициента распределения растворенного вещества зависит от отношения его коэффициентов активности в двух фазах, в которых происходит распределение. Коэффициент активности члена гомологического ряда связан с числом атомов углерода в его молекуле уравнением

$$\ln \gamma_i = a + b n_i \quad (4.4)$$

где γ_i – коэффициент активности i -го члена ряда, имеющего n_i атомов углерода, a и b – константы. Полученные [1] методом ЖРХ данные по определению коэффициентов активности углеводородов в растворе ацетонитрила (рис. 4.1) подтверждают правильность уравнения.



Р и с. 4.1. Коэффициенты активности в ацетонитриле, определены методом распределительной хроматографии при 25°C.
1 – *n*-алканы; 2 – монозамещенные циклогексаны; 3 – олефины-1; 4 – монозамещенные алкилбензолы.

Таким образом,

$$\ln \gamma_i^{(S)} = a_S + b_S n_i ,$$

$$\ln \gamma_i^{(M)} = a_M + b_M n_i ,$$

т.е.

$$\ln y_i^{(M)} - \ln y_i^{(S)} = \ln K_i = (a_M - a_S) + (b_M - b_S) n_i,$$

$$\ln K_i = a' + b' n_i. \quad (4.5)$$

Следовательно, удерживание гомологов увеличивается экспоненциально с числом атомов углерода. При условии что b' достаточно велика, члены любого гомологического ряда могут быть отделены друг от друга с помощью распределительной хроматографии. Конечно, необходимая величина b' зависит от разрешения, обеспечиваемого хроматографической системой. В случае неэффективной колонки необходима пара фаз, обеспечивающая намного большее значение b' , чем в случае эффективной колонки.

Большинство реальных образцов содержит соединения различных типов. Мы можем, воспользовавшись данными работы [1], рассчитать по уравнению (4.4) значения a и b для различных классов веществ в сквалане и ацетонитриле. Результаты расчетов приведены в табл. 4.1.

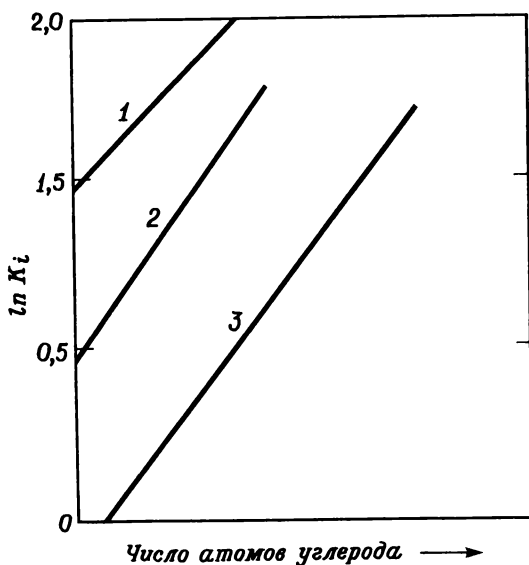
На рис. 4.2 показана зависимость $\ln K_i (= a' + b' n_i)$, полученная для приведенных в табл. 4.1 результатов. Для заданного значения

Таблица 4.1.

Гомологический ряд	Сквалан		Ацетонитрил		В ЖРХ	
	a	b	a	b	a'	b'
<i>n</i> -Алканы	-0,32	0,022	0,57	0,152	0,89	0,130
<i>n</i> -Алкены-1	-0,31	0,020	0,17	0,162	0,48	0,142
Алкилциклогексаны	-0,33	0,010	0,64	0,124	0,97	0,114
Монозамещенные алкилбензолы	-0,28	0,021	-0,38	0,145	-0,10	0,124

$\ln K_i$, т.е. заданного объема удерживания, число атомов углерода у вымываемых членов гомологических рядов увеличивается в следующем порядке: циклогексаны, *n*-алканы, алкены-1, алкилбензолы. Хотя полученные кривые не параллельны, так как меняются величины b' , приближенно можно считать, что селективность системы ацетонитрил – сквалан по отношению к циклогексанам составляет для *n*-алканов 0,5, для алкенов-1 3,5, для алкилбензолов 8,0 удержанных атомов углерода. Другими словами, при использовании ацетонитрила в качестве подвижной фазы при 25°C со сквалана будут вымыты *n*-октилбензол и нонен-1 до того, как появится *n*-гексан. Можно сказать, что система ацетонитрил – сквалан является высокоселективной при разделении алканов и ароматических углеводородов.

Мы детально рассмотрели хорошо описанную систему ацетонитрил-сквалан с тем, чтобы показать практическое значение "селективности". Число систем, для которых доступны термодинамические данные, очень ограничено, поэтому обычно о предполагаемой селективности системы судят исходя не из расчетных, а из эмпирических данных и собственного опыта исследователя. Очень грубо селективность, которую растворитель, вероятно, проявит по отношению к ря-



Р и с. 4.2. Селективность системы ацетонитрил - сквалан по отношению к различным типам углеводородов.

1 - циклогексаны; 2 - алкены; 3 - алкилбензолы.

ду компонентов различного типа, можно оценить по данным о "полярности". Кроме того, селективность можно определить на основании данных о коэффициентах активности. Селективность также можно оценить по двум количественным критериям - "параметру растворимости" Гильдебранда /2/ и критической температуре растворения. Эти свойства, наряду с коэффициентами активности и "полярностью", термодинамически связаны и характеризуют взаимодействие между молекулами различного типа. Поскольку данная книга задумана как практическое руководство по жидкостной хроматографии, мы попытаемся просто показать, каким образом при выборе подходящей пары фаз для распределительной хроматографии можно использовать параметр растворимости или критическую температуру растворения (указанные параметры приведены в виде таблиц в работах /3,4/).

Параметр растворимости определяется как квадратный корень из величины "энергии испарения 1 см³" чистого вещества; его можно

измерить различными способами. Термодинамические свойства бинарных растворов можно связать с квадратом разности параметров растворимости двух компонентов [2]. Отдельные значения параметров растворимости приведены в табл. 4.2.

Таблица 4.2

Параметры растворимости (при 25°C) ряда соединений

Перфтор- <i>n</i> -гексан	5,9	Циклогексан	8,2
Изопентан	6,8	Хлористый этил	8,3
<i>n</i> -Пентан	7,1	Четыреххлористый углерод	8,6
<i>n</i> -Гексан	7,3	Этилбензол	8,8
Гексен-1	7,3	Бензол	9,2
Диэтиловый эфир	7,4	Сероуглерод	10,0
<i>n</i> -Гексадекан	8,0	1,2-Дибромэтан	10,2

Критическая температура растворения T_C является максимальной температурой бинарной жидкой системы, при которой две несмешивающиеся жидкие фазы могут находиться в равновесии.

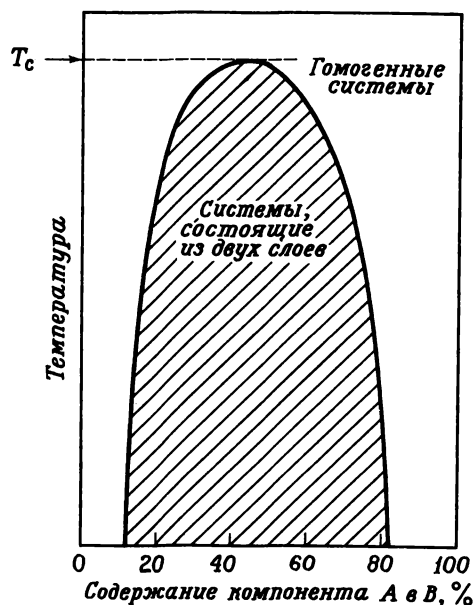


Рис. 4.3 показывает обобщенное соотношение между составом двухкомпонентной смеси и температурой; заштрихованная площадь представляет интервал составов и температур, в котором присутствуют две жидкие фазы. Критическая температура растворения и параметр растворимости связаны выражением

$$2RT_C = f(\delta_A - \delta_B)^2. \quad (4.6)$$

Таким образом, два вещества, имеющие очень близкие параметры растворимости, будут иметь очень низкую T_C и образовывать несмешивающиеся жидкие фазы при очень низких температурах. Поэтому знание параметров растворимости полезно при выборе пар несмешивающихся фаз.

Р и с. 4.3. Критическая температура растворения бинарной смеси.

Критическая температура растворения помогает при оценке селективности. Проанализируем значения T_C для систем, включающих ацетонитрил. В табл. 4.3 приведены значения T_C ряда соединений.

применяемых в системе с ацетонитрилом. Рассматривая соединения группы *A* (алканы), мы можем сделать очень грубую экстраполяцию и найти, что T_C сквалана (гексаметилтетракозана) примерно равна 170°C , т.е. при температуре ниже 170°C система ацетонитрил – сквалан существует в виде находящихся в равновесии двух жидких фаз.

Этот вывод соответствует на-

блюдениям: система сквалан – ацетонитрил сравнительно плохо смешивается и, как показывает практика, пригодна для использования в распределительных системах. Анализируя группу *B*, мы можем прийти к выводу о селективности ацетонитрила по отношению к углеводородам различных типов. Алканы и нафтенy имеют очень близкие значения T_C , что указывает на незначительную разность селективностей между ними. Алкены, у которых T_C примерно на 40°C ниже, чем у алканов, значительно лучше растворимы в ацетонитриле, а растворимость алкилбензолов намного выше. Таким образом, величины T_C указывают, что селективность ацетонитрила возрастает в ряду алканы \approx нафтенy < алкены < бензолы, что согласуется с экспериментальными данными Лока, обсуждавшимися выше.

Итак, мы установили, что величины T_C можно коррелировать с экспериментальными результатами и, основываясь на этих результатах, с достаточной степенью

надежности предполагать, какова будет селективность системы ацетонитрил – сквалан по отношению к другим соединениям, таким, как соединения группы *B* табл. 4.3. Очевидно, по отношению к алканолам и метилкарбоксилатам ацетонитрил будет проявлять умеренную селективность, а по отношению к гликолям – высокую.

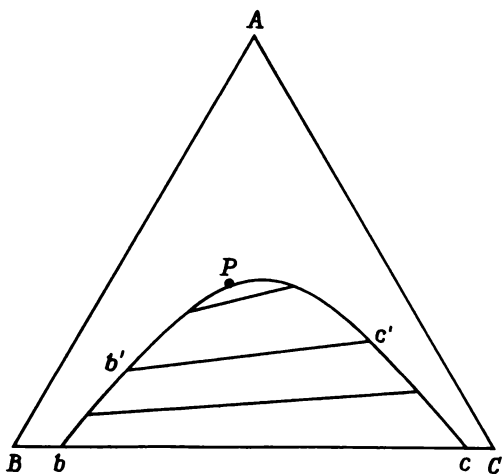
Книга Франсиса /4/ содержит около 200 страниц табулированных критических температур растворения, которые охватывают большинство обычно встречающихся органических растворителей; в по-

Таблица 4.3

Критические температуры растворения бинарных систем с ацетонитрилом

Второй компонент	$T_C, ^\circ\text{C}$
<i>A</i>	
<i>n</i> -Пентан	60
<i>n</i> -Октан	91,5
<i>n</i> -Ундекан	112,5
2,2,4-Триметилпентан	81
<i>B</i>	
Метилциклогексан	78
Гептен-1	38
<i>n</i> -Гептан	84,6
Изопропилбензол	-78
Диизопропилбензол	-15
<i>B</i>	
<i>n</i> -Деканол	22,7
<i>n</i> -Додеканол	35,2
<i>n</i> -Гексадеканол	58
Метилмиристат	11
Метилстеарат	53,1
Метилпальмитат	31,0
Этиленгликоль	-13,5
Пропиленгликоль	0
Триметиленгликоль	-6

вседневной работе ее можно использовать как справочник, позволяющий провести предварительный отбор данных и предсказать селективность системы, а также оценить вероятную степень смешиваемости фаз в потенциально возможных системах при разных температурах колонки.



Р и с. 4.4. Фазовая диаграмма тройной системы, содержащей два несмешивающихся компонента.

До сих пор мы говорили о селективности двухкомпонентных систем, которые при заданной температуре неизбежно существуют в виде двух фаз определенного состава и вследствие этого имеют неизменную селективность. Однако вводя третий компонент, можно в очень широких пределах изменять полярность такой системы из несмешивающихся пар фаз. Согласно фазовой диаграмме, приведенной на рис. 4.4, компоненты B и C полностью смешиваются с A , но почти не смешиваются между собой. Смесь B и C разделяется на две фазы, составы которых соответствуют b и c . Добавленный компонент A рас-

пределяется между двумя слоями, состав которых дается крайними точками прямых, например b' и c' . Линии, связывающие эти точки, обычно расположены не горизонтально, так как A лучше растворяется в одном из компонентов. При последующем добавлении A составы двух фаз сближаются и в конечном счете становятся одинаковыми (точка P). Следовательно, в точке P (точке "сгиба") существует только одна жидкая фаза.

В распределительной хроматографии такие системы могут быть весьма эффективными. Предположим, что компоненты B и C , например вода и гептан, почти взаимно не растворяются и имеют совершенно различные полярности. При добавлении спирта, например этанола, можно получить набор двухфазных трехкомпонентных систем с постепенно меняющейся селективностью. В предельном случае (вблизи точки P) обе фазы будут иметь почти одинаковый состав и поэтому почти одинаковую селективность. На практике прежде чем использовать такую систему, строят фазовую диаграмму и выбирают

прямую ($b's'$), соответствующую требуемой селективности. В качестве подвижной фазы используют раствор, состав которого отвечает точке b' , в качестве неподвижной фазы — состав, определяемый точкой s' . Изменить селективность системы можно, непосредственно добавляя в подвижную фазу один или несколько компонентов до тех пор, пока не установится новое равновесие. Использование этого подхода для получения изменяемой в широком интервале селективности пока еще не было описано в работах по высокоэффективной ЖХ. При выборе и самих компонентов и их соотношений в системе в какой-то степени предполагается использовать метод последовательного приближения, так как в настоящее время обычно невозможно предсказать оптимальную селективность, необходимую для разделения многокомпонентных образцов. Недостатком этого метода является также необходимость тщательного термостатирования. Это справедливо в отношении большинства распределительных систем, и поэтому мы будем говорить об этом особо.

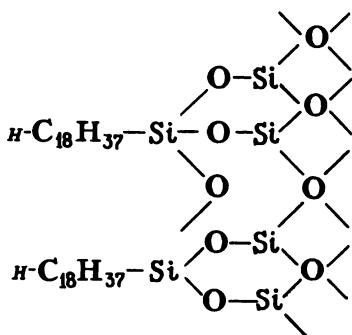
4.3.2. Стабильность двухфазной системы

В идеальной распределительной системе неподвижная жидкая фаза находится в равновесии с подвижной фазой, а количество и распределение неподвижной жидкости в системе остается постоянным. "Неидеальность" системы вызывается различными факторами, например взаимной растворимостью двух контактирующих фаз и изменением растворимости из-за непостоянства температуры.

Существуют два практических подхода, применяемых в ЖРХ для стабилизации систем: 1) использование пары фаз, приведенной предварительно в состояние равновесия, и 2) химическое закрепление неподвижных фаз.

Под процессом предварительного приведения в равновесие пары фаз мы подразумеваем насыщение подвижной фазы неподвижной фазой при рабочей температуре колонки. В случае тщательного выполнения этой операции неподвижная фаза, находящаяся в колонке, не сможет растворяться в подвижной. В результате будет отсутствовать перенос неподвижной фазы, хотя, конечно, обмен молекулами между фазами не исключается.

Опыт показывает, что привести фазы в равновесие сложнее, чем это иногда кажется. Мы рекомендуем следующую методику. Для насыщения подвижной фазы ее встряхивают в течение 24 ч с избытком неподвижной фазы при температуре колонки. Перед использованием насыщенную подвижную фазу оставляют на несколько часов стоять, чтобы дать осесть суспендированным каплям неподвижной фазы. Кроме того, в хроматографической системе между резервуаром с элюентом и разделительной колонкой помещают так называемую предварительную колонку; причем обе колонки должны находиться в од-



II

Сейчас выпускаются три сорта дурапака, в которых с пористым стеклом связаны радикалы оксидипропилнитрила, карбовакса 400* и *n*-октана. Селективность этих материалов соответствует предельным значениям, и эти материалы могут с успехом использоваться для исследования жидкостных распределительных систем. Основная проблема, которая может возникнуть при их использовании, заключается в возможной чувствительности к гидролизу связей, удерживающих неподвижную фазу на носителе. Поэтому может оказаться необходимым тщательное высушивание элюентов. Становится доступным также ряд зипаксов со связанными фазами. Совершенно ясно, что и другие фирмы в ближайшее время будут организовывать выпуск таких материалов.

4.3.3. Зависимость динамических свойств системы

от выбора системы фаз

На динамические свойства хроматографической системы, а следовательно, и на ее эффективность, наряду с целым рядом других факторов, оказывают влияние вязкость подвижной фазы и коэффициенты диффузии в фазах. Из этих свойств проще всего предсказать влияние вязкости подвижной фазы, так как величины вязкости многих органических жидкостей легко доступны, а влияние вязкости, в частности, на длительность анализа при заданном давлении определяется очень просто.

Коэффициенты диффузии влияют больше на характеристику колонки, чем на длительность анализа. Высокие скорости диффузии в неподвижной фазе благоприятствуют быстрому установлению равновесия

*Фирменное название полиэтиленгликоля с молекулярным весом 400. — *Прим. перев.*

между растворенным веществом и несмешивающимися фазами и, таким образом, ведут к улучшению разделения. В то же время высокие коэффициенты диффузии в подвижной фазе оказывают противоположное влияние. К сожалению, данные об этих свойствах ограничены.

Подвижные фазы в жидкостной распределительной хроматографии обычно состоят из веществ, имеющих сравнительно маленькие органические молекулы или смеси нескольких таких материалов. Объясняется это тем, что используемые жидкости должны иметь небольшую вязкость, для того чтобы давление, необходимое для продавливания раствора через заполненный слой, было минимальным. Для данной степени разделения длительность анализа и вязкость элюента возрастают параллельно. Это означает, что если увеличивается вдвое вязкость подвижной фазы, то длительность разделения также возрастает вдвое. В табл. 4.4 приведены вязкости различных органических соединений, показывающие влияние на вязкость размера и числа полярных групп. Кроме того, в табл. 4.4 приведены диэлектри-

Таблица 4.4

	Молекулярный вес	Вязкость при 20°C, сП	Диэлектрическая проницаемость
Пентан	72	0,23	1,8
Декан	142	0,92	2,0
Метилацетат	74	0,37	8,5
Бутилацетат	116	0,73	5,01
Бутилстеарат	341	8	3,1
Метанол	32	0,60	32,6
Пропанол-2	60	2,3	18,3
Этандиол-1,2	62	19,9	37,7

ческие проницаемости этих веществ. Диэлектрическую проницаемость органической жидкости можно грубо приравнять плохо определенному свойству, которое хроматографисты называют "полярностью". В качестве первого, очень грубого приближения можно считать, что селективность подвижной фазы по отношению к неподвижной, в качестве которой используются алканы, увеличивается с возрастанием "полярности".

Приведенные в табл. 4.4 данные показывают, что в ряду подобных органических соединений одновременно с ростом селективности (диэлектрической проницаемости) усиливается нежелательное влияние на вязкость молекулярного размера и сложности соединения.

В качестве общего правила Снайдер и Сондерс /8/ предлагают использовать подвижные фазы, имеющие при рабочей температуре вязкости не более 0,4 сП. Следовательно, для большинства практи-

ческих целей мы можем ограничить выбор подвижных фаз небольшим количеством веществ. Легкодоступные органические растворители с вязкостями до 0,4 сП при температуре 20°C приведены в табл. 4.5, которая включает также некоторые другие более вязкие, но все-таки полезные подвижные фазы.

Таблица 4.5

Органические растворители с низкой вязкостью,
рекомендуемые для использования в качестве
подвижной фазы в ЖРХ

	Вязкость при 20°C, сП
n-Пентан	0,23
n-Гексан	0,31
n-Гептан	0,41
Диэтиловый эфир	0,23
Изопропиловый эфир	0,32
Бутанон-2	0,40
Метилацетат	0,37
Дихлорметан	0,44
Хлористый изопропил	0,33
Ацетонитрил	0,37
Сероуглерод	0,37
Диэтиламин	0,38
Бензол	0,65 ^a
Толуол	0,59
Метанол	0,60
Этанол	1,20
Изопропанол	2,3
Уксусная кислота	1,26
Этилацетат	0,45
Хлороформ	0,57
Нитрометан	0,67
Пиридин	0,94

^a При 30°C.

Используя приведенные значения, можно приближенно оценить ту потерю времени или давления, которую повлечет за собой использование данной подвижной фазы. Для разных типов веществ температурный коэффициент вязкости меняется значительно. Он особенно велик для бензола, и таблица показывает, что при увеличении температуры на 10°C вязкость значительно снижается. Поэтому следует отметить,

что даже умеренное повышение температуры позволяет значительно ускорить анализ. Коэффициенты диффузии растворенных веществ в жидкостях обычно примерно на пять порядков меньше коэффициентов диффузии газов.

Таким образом, вклад в высоту тарелки, вносимый диффузией в подвижной фазе, в жидкостной хроматографии намного меньше, чем в газовой. В одной из предыдущих глав мы говорили о величине вклада в размывание полосы диффузии растворенного вещества в подвижной и неподвижной фазах и просто повторим приведенные там выводы (см. стр. 33).

Установлено, что скорость диффузии в неподвижной фазе обычно много меньше, чем в подвижной фазе, поскольку жидкости неподвижной фазы обычно сравнительно вязкие и имеют высокий молекулярный вес. Поэтому влиянием диффузии при выборе неподвижной фазы можно пренебречь. О выборе подвижной фазы следует поговорить несколько подробнее; использование более вязких элюентов способствует получению тарелки меньшей высоты. В то же время, чтобы уменьшить длительность анализа, рекомендуется выбирать подвижные фазы с малой вязкостью. Однако, поскольку абсолютная величина влияния вязкости на высоту тарелки невелика, то почти всегда используют подвижные фазы с низкой вязкостью.

Итак, наиболее важный практический вывод: подвижные фазы должны иметь низкую вязкость, это способствует осуществлению быстрых анализов при умеренных давлениях.

4.4. НОСИТЕЛИ

В распределительной хроматографии неподвижная жидкая фаза удерживается материалами, которые обычно имеют большую удельную поверхность, небольшой размер частиц (1–200 мкм) и инертны.

Вещества, отвечающие этим требованиям, тщательно изучены, так как они используются в газовой хроматографии, и хорошо известны по их структуре /9/ и степень взаимодействия с разделяемыми веществами /10/ в газовой хроматографии. В качестве носителей неподвижной жидкой фазы в распределительной хроматографии могут быть использованы диатомитовая земля, кизельгур, пористое стекло, пористые полимеры и такие адсорбенты, как силикагель и окись алюминия, а также целлюлоза. Принципиально практическая разница между носителями для жидкостной и газовой хроматографии заключается в том, что для жидкостной хроматографии предпочтительнее использовать носители, частицы которых намного меньше (1–50 мкм).

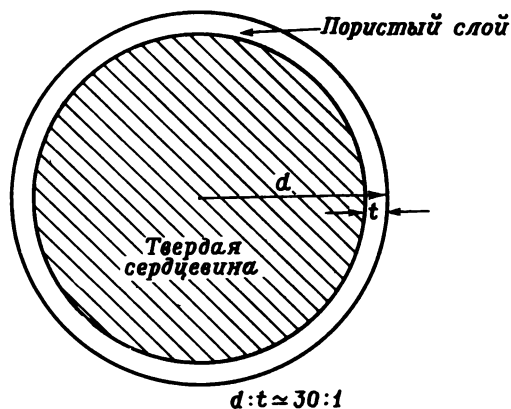
Следует отметить, что одним из преимуществ жидкостной хроматографии является возможность разделять сравнительно нелетучие материалы при умеренных температурах. Это особенно важно, если не все компоненты образца стабильны. Поэтому всегда следует пом-

нить о возможности взаимодействия между носителями и образцом; при разделении нестойких материалов не рекомендуется использовать в качестве носителей розовый огнеупорный кирпич (хромосорб Р, стерхамол, силосел и т.д.), а также силикагель и окись алюминия.

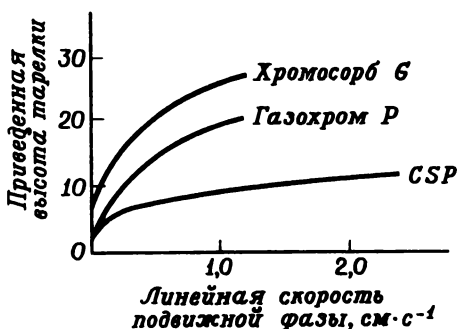
В настоящее время разрабатываются новые, особенно ценные материалы. Это, например, материалы с контролируемой поверхностной пористостью (КПП), выпускаемые фирмой "Du Pont", стеклянные шарики с травленной поверхностью — фирма "Corning Glass Co.", а также корасилы (корасил I и корасил II) — фирма "Waters Associates".

Частицы КПП-носителей и корасила (рис. 4.5) имеют твердую сферическую кремнеземную сердцевину и пористый поверхностный слой, имеющий контролируемую толщину и размер пор. Отношение d/t в КПП-носителях примерно равно 30.

Неподвижная жидкая фаза удерживается в пористом слое точно так же, как она удерживалась бы в полностью пористой частице; однако из-за небольшой толщины пленки удерживаемой неподвижной жидкости имеется важное преимущество с точки зрения характеристики колонки. Размывание полос зависит от времени диффузии разделяемого вещества через пленку неподвижной жидкости, распределенную на пористом носителе, и становится все более и более серьезным по мере возрастания скорости течения подвижной фазы. Колонки с КПП-носителями должны иметь хорошие характеристики и их преимущества должны быть особенно заметны при скоростных анализах. Данные Киркланда [11] (рис. 4.6) подтверждают, что обычное ухудшение эффективности ко-



Р и с. 4.5. Поверхностно-пористая частица, или частица с контролируемой поверхностной пористостью.



Р и с. 4.6. Влияние носителя на характеристику колонки. Неподвижная фаза — β, β' — оксидипропионитрил [11].

лонки при возрастании скорости потока элюента очень значительно снижается при использовании таких носителей. Ордината показывает приведенную высоту тарелки, которая равна действительной высоте тарелки, разделенной на средний диаметр частицы. Это удобный способ приведения данных по высотам тарелок к общему стандарту. Следует отметить, что в то время как характеристики колонок с обычными полностью пористыми носителями (т.е. хромосорб G и газохром P) резко ухудшаются с увеличением скорости подвижной фазы, увеличение высоты тарелки, наблюдаемое в случае КПП-носителя, значительно меньше.

4.5. Некоторые практические рекомендации

4.5.1. Приготовление неподвижных фаз

До сравнительно недавнего времени в качестве неподвижных фаз в распределительной хроматографии использовались жидкости, нанесенные на поверхность пористых частиц. Методы приготовления материалов в форме, пригодной для заполнения колонок, просты и идентичны используемым в газовой хроматографии. Известное количество неподвижной жидкой фазы растворяется в относительно летучем растворителе, раствор добавляется к соответствующему количеству пористого носителя, смоченного тем же растворителем. Растворители дают испариться; в процессе испарения твердую фазу, растворитель и неподвижную жидкость перемешивают, чтобы жидкость равномерно распределилась по поверхности носителя. Следы растворителя удаляют нагреванием и вакуумированием. Полученный в результате такой обработки продукт должен быть сыпучим. Приведенная выше методика ни в коем случае не является единственной; она предлагается только тем, кто не имеет опыта в приготовлении неподвижной фазы.

Химически связанные неподвижные фазы приготовить гораздо сложнее. Обычно поверхностные гидроксильные группы пористых носителей или адсорбентов обрабатывают подходящими хлорсиланами (см., например, /11/). Несмотря на высокую стоимость этих продуктов, изготовление их собственными силами является нецелесообразным, если только изготовление образцов проводится не в исследовательских целях.

4.5.2. "Нагрузка" по жидкой фазе и величина образца

Под "нагрузкой" подразумевают количество неподвижной жидкой фазы, приходящейся на единицу веса (или объема) носителя. Носители типа диатомитовых земель поглощают жидкости в количестве, равном половине собственного веса, не становясь клейкими.

Обычный диапазон составов химически не связанных неподвижных фаз следующий: 1–40 частей на 100 частей носителя. Химически связанные материалы могут иметь до 25% органических групп, связанных с носителем; если частицы имеют твердую непористую сердцевину, содержание органических групп снижается примерно до 0,5–1%. В случае КПП-носителей содержание химически не связанных жидких фаз также приблизительно составляет 0,5–1%.

Содержание жидкости в неподвижной фазе определяет максимально возможный объем (или вес) образца, который можно эффективно разделить на этой фазе. В первом приближении, чем больше количество жидкости, тем больше может быть образец, с которым можно работать. В высокоэффективной колоночной распределительной хроматографии размеры образцов приблизительно равны используемым в газовой хроматографии. Для сильно нагруженных колонок, содержащих свыше 20% неподвижной жидкой фазы, вес образцов может достигать 10 мг, тогда как в случае легко нагружаемых пористо-поверхностно-пористых носителей удобнее использовать образцы до 1 мг. Если образец слишком велик, пики имеют асимметричную форму, разделяющая способность уменьшается и воспроизводимость удерживаемых объемов ухудшается.

Список литературы

1. Locke D.C., J. Chromatog., **35**, 24 (1968).
2. Hildebrand J.H., Scott R.L., Regular Solutions, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, 1962.
3. Solubility of Non-Electrolytes, Dover, New York, 1964, p. 435 et seq.
4. Francis A.W., Critical Solution Temperatures, American Chemical Society, Washington, 1961.
5. Abel F.W., Pollard F.H., Uden P.C., Nickless G., J. Chromatog., **22**, 23 (1966).
6. Stewart H.N.M., Perry S.G., J. Chromatog., **37**, 97 (1968).
7. Halasz I., Sebastian I., Angew. Chem., Intern. Ed. (English), **8**, 453 (1968).
8. Snyder L.R., Saunders D.L., J. Chromatog. Sci., **7**, 195 (1969).
9. Ottenstein D., Advan. Chromatog., **3**, 137 (1966).
10. Kusy V., Anal. Chem., **37**, 1748 (1965).
11. Kirkland J.J., J. Chromatog. Sci., **7**, 2, 361 (1969).

Список дополнительной литературы

- Williamson A.G., An Introduction to Non-Electrolyte Solutions, Oliver and Boyd, Edinburgh, 1967. Хорошее, не слишком детальное изложение физической химии растворов неэлектролитов.
- Keller R.A., Giddings J.A., Theoretical basis of partition chromatography, Chromatography, Heftmann E., ed., Reinhold, New York, 2nd ed., 1967. Общее введение в проблему; приводится большое число ссылок.

СИТОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. МЕХАНИЗМ ПРОЦЕССА
И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

5.1. ВВЕДЕНИЕ

Ситовая хроматография – это вид жидкостной хроматографии, в котором растворенное вещество распределяется между свободным растворителем и растворителем, находящимся во внутренних полостях пористых частиц. Свободный растворитель служит подвижной фазой, а пористые частицы, содержащие растворитель, образуют неподвижную фазу (часто неподвижной фазой неточно называют сами пористые частицы). Разделение зависит от размеров внутренних полостей, так как степень проникновения молекул растворенного вещества определяется величиной молекул последнего. Очень большие молекулы не могут проникнуть в неподвижную фазу и вымываются при прохождении через колонку объема растворителя, равного объему колонки, т.е. объему свободного растворителя в колонке. Если молекулы растворенного вещества достаточно малы, чтобы проникнуть в растворитель, содержащийся в пористых частицах, то они элюируются объемом растворителя, равным сумме свободного объема колонки и объема растворителя, содержащегося в неподвижной фазе, т.е. равным общему объему растворителя в колонке.

Разделение методом ситовой хроматографии в отсутствие адсорбционных эффектов происходит в соответствии с размерами молекул образца, причем большие молекулы элюируются раньше малых.

Все растворенные вещества вымываются в сравнительно узком интервале объемов элюирования, соответствующем разности между свободным и общим объемами растворителя в колонке. Объем элюирования в этом интервале определяется тем же соотношением, которое было найдено для распределительной хроматографии, т.е.

$$V_r = V_0 + KV_s, \quad (5.1)$$

где V_r – объем элюирования растворенного вещества, V_0 – свободный объем колонки, V_s – объем пор в неподвижной фазе и K – коэффициент распределения растворенного вещества между свободным растворителем и растворителем в неподвижной фазе. Таким образом, параметр KV_s можно рассматривать как объем растворителя в неподвижной фазе, доступный для растворенного вещества. Если раст-

растворитель в неподвижной фазе полностью "проницаем" для растворенного вещества, $K=1$; в противном случае $K=0$.

Такой ограниченный диапазон коэффициентов распределения характерен для ситовой хроматографии. Это означает, что все компоненты элюируются при пропускании от V_0 до $V_0 + V_s$ объемов растворителя. Очевидно, что число компонентов, которые можно разделить, связано с эффективностью колонки. В других видах хроматографии коэффициент K может превышать 1, и рассмотренное выше ограничение в таких случаях не применяется. Гиддингс [1] вычислил максимальное число пиков, образующихся в колонке при разделении методом ситовой, газовой и жидкостной хроматографии на колонках с заданным числом теоретических тарелок. Полученные им результаты приведены в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Число теоретических тарелок	Максимальное число пиков в различных видах хроматографии		
	ситовая	газовая	жидкостная
100	3	11	7
400	5	21	13
1000	7	33	20
2500	11	51	31
10 000	21	101	61

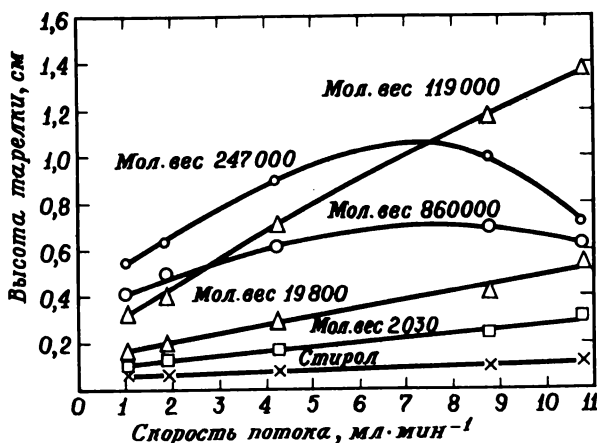
Итак, в ситовой хроматографии для хорошего разделения нужны достаточно длинные колонки. Вследствие того что коэффициент K не может превышать 1, при величине объема элюирования, равной $V_0 + V_s$, в колонке не остается вещества. Поэтому можно подобрать время ввода образцов таким образом, чтобы избежать частичного перекрытия предыдущей и последующей проб и разделять на одной колонке одновременно несколько образцов. Вначале в ситовой хроматографии чаще всего использовались водные растворы, а в качестве неподвижной фазы применялись сшитые декстраны. Когда эти гели набухают, они становятся сравнительно мягкими. В основном разделение на декстранах проводили в стеклянных колонках при малой скорости потока растворителя. Гели главным образом применяют для разделения биохимических веществ, а также для определения молекулярных весов. В последнем случае наибольший успех был достигнут при исследовании глобулярных белков. В данной главе основное внимание будет уделено разделению с помощью неводных растворителей.

Неподвижные фазы, используемые при работе с водными растворами, не могут применяться в случае органических растворителей, так как они не набухают и остаются непроницаемыми. Мур [2] об-

наружил, что для работы с многими органическими растворителями можно использовать пористые полистиролдивинилбензолные гели. Используя рефрактометрический детектор, Мур сконструировал прибор, позволяющий проводить фракционирование промышленных полимеров; этот прибор в настоящее время широко применяется в промышленности.

5.2. РАЗМЫВАНИЕ ПИКОВ В СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Если растворы, вводимые в колонки достаточно разбавлены, то форма получаемых пиков аппроксимируется гауссовой кривой и приближенно подчиняется теории "случайного шага" (см. гл. 2). Как и в распределительной хроматографии, продольной диффузией можно пренебречь. С ростом молекулярного веса растворенного вещества увеличивается сопротивление массопередаче; при определенном молекулярном весе оно достигает максимума, затем начинает уменьшаться и, наконец, становится равным нулю, когда молекулы растворенного вещества оказываются слишком большими, чтобы проникнуть в неподвижную фазу.



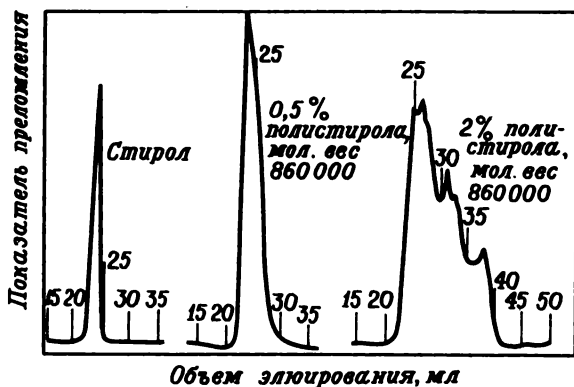
Р и с. 5.1. Зависимость высоты тарелки от молекулярного веса образца и скорости потока для стирола и полистиролов [3]. Неподвижная фаза: стирогель с частицами диаметром 10^4 Å; подвижная фаза: хлороформ.

Следовательно, размывание пиков полностью определяется вихревой диффузией. Это видно на рис. 5.1; полистирол с молекулярным весом 860 000, полностью исключаемый стирогелем, вымывается объемом, равным свободному объему колонки /3/.

При низких скоростях подвижной фазы влияние массопередачи на высоту тарелки для больших молекул выше, чем для маленьких, но в первом случае эффект увеличения скорости подвижной фазы менее выражен. Как следует из теории "случайного шага", размывание пика, вызываемое вихревой диффузией, уменьшается с уменьшением размера частиц неподвижной фазы; увеличение ширины фракции дает небольшой эффект.

Условия для уменьшения ширины пика те же, что и в других видах хроматографии: узкие колонки, небольшие частицы неподвижной фазы и низкая вязкость растворителей. Высота тарелки увеличивается с повышением скорости растворителя, но эффект незначителен, по крайней мере в случае не очень большого увеличения скорости.

Ограничения по концентрации раствора, вводимого в колонку, больше для вещества с высоким молекулярным весом. Можно ввести в колонку 5%-ный раствор вещества с молекулярным весом 500, но если исследуемое вещество – полимер с высоким молекулярным весом, то при использовании раствора такой же концентрации пик бу-



Р и с. 5.2. Зависимость размывания от молекулярного веса и концентрации [3].
Неподвижная фаза: гладкие стеклянные шарики; подвижная фаза: толуол.

дет сильно искажен (рис. 5.2) [3]. Обусловлено это, во-первых, высокой вязкостью раствора полимера, которая увеличивает сопротивление массопередаче, и, во-вторых, размыванием пика вследствие вихревой диффузии. Полимеры с высоким молекулярным весом целесообразнее вводить в колонку в виде 0,1–0,5%-ных растворов. Длительность ввода пробы мало влияет на форму пика, но тем не менее вводить образец в колонку следует как можно быстрее.

5.3. ТЕОРИЯ СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

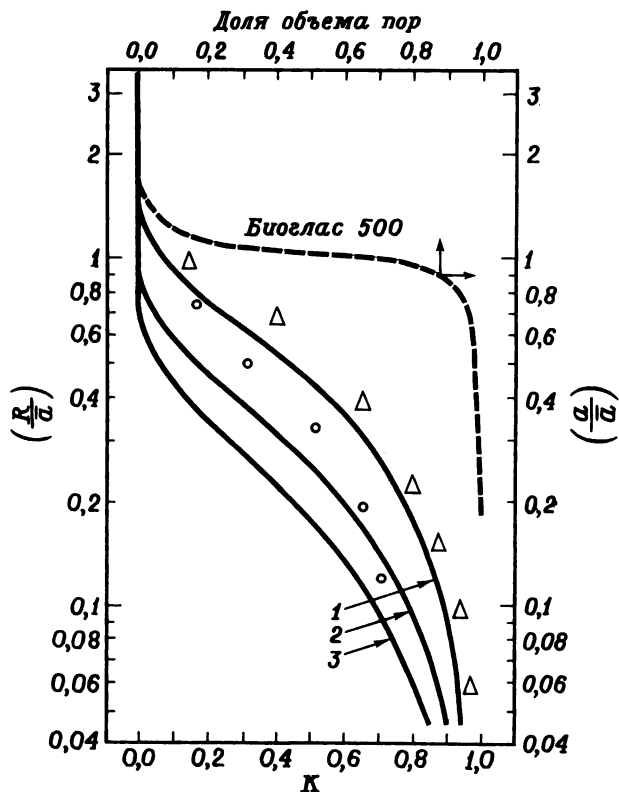
Объем элюирования молекулы зависит от доли времени, которое молекула проводит в неподвижной фазе. Определяется это вероятностью молекулярной диффузии в поры и, следовательно, в основном зависит от размера пор и молекулы. Благодаря тому что коэффициент диффузии молекулы в неподвижной фазе не слишком отличается от коэффициента диффузии в подвижной фазе, время, необходимое для диффузии молекулы внутрь частицы неподвижной фазы и обратно, мало по сравнению с временем, в течение которого полоса растворенного вещества проходит мимо частицы. Поэтому разделение можно рассматривать как равновесный процесс.

Некоторые из неподвижных фаз, которые стали использоваться первыми, заметно набухают при погружении в хроматографический растворитель, например, сшитые декстраны набухают в воде, резины — в различных органических растворителях. Такое набухание вызывается тем, что осмотическое давление, производимое молекулами полимеров, уравнивается упругим сокращением полимерной сетки. Гинсберг и Коен /4/ предположили, что осмотическое давление ответственно за исключение неэлектролитов из сшитых декстранов. В гелях могут возникать высокие давления, что вызывает уменьшение растворимости молекул растворенного вещества. Кроме того, растворимость падает с увеличением размеров молекул. Согласно этой теории, растворенное вещество распределяется между двумя частями подвижной фазы, одна из которых находится под давлением.

Однако ситовый эффект исключения лишь отчасти объясняется осмотическим давлением, хотя в набухших гелях последнее нельзя не учитывать.

Тот факт, что объем растворителя в неподвижной фазе, доступный для растворенного вещества, уменьшается при увеличении молекулярного веса последнего, позволил в ранних работах предложить простые геометрические теории ситового разделения. Одна из первых моделей предложена Поратом /5/. Согласно Порату, поры в неподвижной фазе имеют коническую форму, поэтому глубина, на которую могут проникнуть молекулы растворенного вещества, тем меньше, чем больше их радиус. Лаурент и Килландер /6/ предложили более реалистическую модель; они допустили, что полимерные цепи, образующие матрицу неподвижной фазы, представляют собой хаотически распределенные жесткие стержни. Они использовали формулу, выведенную Огстоном /7/, чтобы показать, как изменяется коэффициент распределения сферических молекул в зависимости от их радиуса, а также от концентрации стержней и радиусов последних. Порат, а также Лаурент и Килландер подтвердили свои модели экспериментально, но примененные критерии были, возможно, недостаточно чувствительны. Исходя из данных теорий можно было бы ожидать, что разделе-

ние не должно иметь места в тех случаях, когда молекулы меньше пор. Однако Мур и Аррингтон /8/, Де Врие и др. /9/ установили, что для гибких молекул это не подтверждается.



Р и с. 5.3. Данные, полученные при разделении на неподвижных фазах с различным распределением пор по размерам, и теоретически кривые Казассы [3].
Неподвижная фаза: Δ биоглас 500, \circ биоглас 200; форма пор: 1 — щелевидные, 2 — цилиндрические, 3 — сферические.

Наиболее удовлетворительными из выдвинутых до сих пор теорий явились основанные на термодинамических предположениях теория Казассы /10/, развитая им для молекул с гибкой цепью, и теория Гиддингса и др. /11/ для сферических молекул. Конфигурация молекул с гибкой цепью постоянно изменяется, но молекулы имеют оп-

ределенный статистический средний размер. Предположим, что такая молекула входит в пору. Если пора не слишком велика, молекула должна испытывать некоторую потерю конфигурационной энтропии. Казасса показал, что сопутствующее изменение энтальпии незначительно, поэтому изменение свободной энергии, и, следовательно, коэффициента распределения определяется изменением энтропии. Казасса показал также, что коэффициент распределения определяется только величиной молекулы и размером пор. Ему удалось вычислить коэффициент распределения полистиролов в неподвижной фазе пористое стекло — толул; расчетные данные хорошо согласуются с данными хроматографического анализа. В этом отношении интересен рис. 5.3, взятый из работы /3/. На оси абсцисс отложены коэффициенты распределения K растворенного вещества, вычисленные в соответствии с теорией Казассы как функция радиуса вращения R и размера поры a для пор различной формы. Сплошными линиями показаны теоретические кривые. На рисунке приведены результаты хроматографического разделения на колонках, заполненных биогласом 500 и биогласом 200. Пунктирная линия характеризует распределение пор в биогласе 500.

Казасса и Тагами /12/ показали, что равновесная теория применима даже при высоких скоростях потока при условии, что данная молекула подвергается многократным переходам между двумя фазами в процессе движения по колонке. Это объясняет слабое влияние, оказываемое изменением скорости потока на величины объемов элюирования.

5.4. НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Остальная часть этой главы посвящается описанию свойств неподвижных фаз, применяемых для разделения методом ситовой хроматографии в неводных средах. Авторы хотели бы дать читателю некоторое представление о выпускаемых промышленностью материалах этого типа. В зависимости от состава указанные неподвижные фазы можно разделить на две группы. Пористые силикагели и стекла являются неорганическими полимерами, в то время как алкилированные шитые декстраны, поливинилацетаты и полистирол имеют органическую матрицу. Эти органические полимеры имеют поперечные связи и поэтому, если они не разрушаются, нерастворимы во всех растворителях. Однако они набухают в определенных растворителях, причем степень набухания зависит от растворителя, степени шитости и метода приготовления.

Важным свойством неподвижной фазы является то, что она должна давать достаточное разделение в области интересующего нас молекулярного веса. Часто единственной доступной информацией явля-

ется предел ситового исключения. В этом случае можно предположить, что максимальная разделяющая способность будет наблюдаться для молекул с молекулярным весом на 1–1,5 порядка ниже этого предела; даже наиболее пористые вещества дают некоторое разделение соединений с низким молекулярным весом. Все соединения с молекулярным весом выше предела ситового исключения элюируются вместе без разделения. Используя неподвижную фазу с низкой пористостью, можно провести удовлетворительное разделение небольших молекул. Однако чтобы получить приблизительно линейную зависимость логарифма молекулярного веса от объема элюирования для высших полимеров, которые могут содержать молекулы с молекулярным весом от 10^3 до 10^6 , нужно использовать несколько колонок, соединенных последовательно, причем каждая должна быть заполнена гелем различной пористости.

Следует отметить, что общее число теоретических тарелок в такой комбинации колонок вовсе не обязательно равняется сумме чисел тарелок в индивидуальных колонках /13/. Если колонки примерно эквивалентны, т.е. длины колонок и объемы элюирования почти идентичны, то общее число теоретических тарелок N для n колонок, соединенных последовательно, дается уравнением

$$N = n^2 / \sum (1/N_i), \quad (5.2)$$

где N_i — число теоретических тарелок i -й колонки.

Распределение частиц по размерам в неподвижной фазе должно быть оптимальным (оптимальная фракция); чем уже фракция для данного среднего диаметра, тем меньше перепад давления в колонке.

Неподвижная фаза должна быть стабильной, чтобы не было необходимости в частых калибровках.

Важное значение имеют механическая прочность и термическая стабильность неподвижной фазы. Степень набухания должна быть небольшой, так как мягкая насадка может осесть во время работы и изменить проницаемость колонки. К тому же ненабухающими веществами легче заполнять колонки, и замена растворителя в такой колонке мало влияет на ее эффективность.

Если желательно, чтобы разделение проводилось только по размеру молекул, то адсорбционные явления должны отсутствовать, хотя их действие часто можно уменьшить модификацией поверхности или путем использования полярного растворителя. Поэтому желательно выбирать неподвижные фазы, в которых влияние адсорбции незначительно. Роль растворителя в этом виде хроматографии менее важна. Выбор в основном зависит от растворимости пробы и типа детектора. Температура растворителя определяется главным образом растворимостью образца; некоторые полимеры растворимы только при повышенных температурах, например полиэтилен и пропилен обычно становятся текучими при 130°C .

Таблица 5.2

Неподвижные фазы для ситовой хроматографии,
выпускаемые промышленностью^а

Неподвижная фаза	Диаметр пор, Å	Молекулярный вес (предел ситового исключения)	Молекулярный вес (рабочий интервал)	Фирма ^б
Пористое стекло (Bio-Glas)				
Биоглас 200	200	30 000 ^в	3 000-30 000 ^в	1
Биоглас 500	500	100 000 ^в	10 000-100 000 ^в	1
Биоглас 1 000	1 000	500 000 ^в	50 000-500 000 ^в	1
Биоглас 1 500	1 500	2 000 000 ^в	400 000-2 000 000 ^в	1
Биоглас 2 500	2 500	9 000 000 ^в	800 000-9 000 000 ^в	
CPG -10-75 ^г	75	28 000 ^д	-	2,3
CPG -10-125	125	48 000 ^д	-	2,3
CPG -10-175	175	68 000 ^д	-	2,3
CPG -10-240	240	120 000 ^д	-	2,3
CPG -10-370	370	400 000 ^д	-	2,3
CPG -10-700	700	1 200 000 ^д	-	2,3
CPG -10-1250	1 250	4 000 000 ^д	-	2,3
CPG -10-2000	2 000	12 000 000 ^д	-	2,3
Пористый силикагель (Porasil, Merck-0-gel)				
Порасил 60	100	60 000	500-60 000	3
Порасил 250	100-200	250 000	5 000-200 000	3
Порасил 400	200-400	400 000	5 000-400 000	3
Порасил 1 000	400-800	1 000 000	10 000-1 000 000	3
Порасил 1 500	800-1 500	1 500 000	100 000-1 500 000	3
Порасил 2 000	1 500	2 000 000	500 000-	3
Меркогель				
Si 150	120-220	50 000 ^е	-	4
Меркогель				
Si 500	300-700	400 000 ^е	-	4
Меркогель				
Si 1000	700 - 1300	1 000 000 ^е	-	4
Алкилированные сшитые декстраны (Sephadex)				
Сефадекс LH20	-	-	-	5
Поливинилацетатные гели (Merck-0-gel)				
Меркогель				
OR 750		750 ^ж	-	4
Меркогель				
OR 1500		1 500 ^ж	-	4

Продолжение таблицы 5.2

Неподвижная фаза	Диаметр, пор, Å	Молекулярный вес (предел ситового исключения)	Молекулярный вес (рабочий интервал)	Фирма ^б
Меркогель OR 5000		5 000 Ж	—	4
Меркогель OR 20000		20 000 Ж	—	4
Полистирол-дивинилбензольный гель (Styragel, Bio Beads)				
Стирогель 39720		60 В	—	3
Стирогель 39721		100 В	—	3
Стирогель 39722		250 В	—	3
Стирогель 39723		500 В	—	3
Стирогель 39724		1 000 В	—	3
Стирогель 39725		3 000 В	—	3
Стирогель 39726		10 000 В	—	3
Стирогель 39727		30 000 В	—	3
Стирогель 39728		100 000 В	—	3
Стирогель 39729		300 000 В	—	3
Стирогель 39730		1 000 000 В	—	3
Стирогель 39731		10 000 000 В	—	3
Биобедс S-X1		14 000 В	600-14 000	1
Биобедс S-X2		2 700 В	100- 2 700	1

Неподвижная фаза	Диаметр пор, Å	Молекулярный вес (предел ситового исключения)	Молекулярный вес (рабочий интервал)	Фирма ^б
Биобедс S-X3		2 000 ^в	До 2 000	1
Биобедс S-X4		1 400 ^в	До 1 400	1
Биобедс S-X8		1 000 ^в	До 1 000	1

^а Свойства перечисленных неподвижных фаз можно найти в справочнике А.А. Лурье "Сорбенты и хроматографические носители", изд-во "Химия", М., 1972. — *Прим. перев.*

^б Фирмы, выпускающие перечисленные в таблице неподвижные фазы:

- 1 — Bio-Rad Laboratories, 32nd and Griffin Avenue, Richmond, Calif. 94804;
 2 — Chromatography Products, Corning Glass Works, Corning, N.Y. 14830;
 3 — Waters Associates Inc., 61 Fountain Street, Framingham, Mass. 01701;
 4 — E. Merck and A.G. Darmstadt, W. Germany; 5 — Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden.

^в Для полистиролов в толуоле.

^г Пористые стекла с контролируемыми размерами пор.

^д Для водных растворов декстранов.

^е Для полистиролов в хлороформе.

^ж Для полистиролов в тетрагидрофуране.

Таблица 5.3

Полимерные стандарты для ситовой хроматографии

Полистирол		
Номинальный молекулярный вес	M_w/M_n	Фирма ^а
600	1,10	1, 4
2 100	1,10	1, 4
4 000	1,10	1
10 000	1,06	1, 4
20 000	1,06	1, 4
51 000	1,06	1
97 200	1,06	1, 4
200 000	1,06	1, 4
498 000	1,20	1, 4
670 000	1,15	1, 4
1 800 000	1,20	1, 4
179 000	1,05	3

Полиэтилен

Максимальный молекулярный вес	M_w/M_n	Фирма ^а
7 100	1,7	1
17 900	1,95	1
27 700	2,0	1
32 000	6,0	1
35 700	4,2	1
41 700	3,7	1

Поливинилхлорид

M_w	M_n	M_w/M_n	Фирма ^а
68 000	25 500	2,61	1, 4
118 200	41 000	2,88	1, 4
132 000	54 000	2,44	1, 4

Линейный полибутадиен

M_w	M_n	M_w/M_n	Фирма ^а
17 000	16 100	1,56	2
170 000	135 000	1,26	2
272 000	206 000	1,32	2
332 000	226 000	1,47	2
432 000	286 000	1,51	2

Линейный гидрированный полибутадиен

M_w	M_n	M_w/M_n	Фирма ^а
108 000	82 000	1,32	2
164 000	141 000	1,16	2
194 000	126 000	1,54	2
420 000	158 000	2,66	2

^аФирмы, выпускающие перечисленные
в таблице неподвижные фазы:

1 – Pressure Chemical Co., 3419 Smallman St., Pittsburgh, Pa. 15201;

2 – Phillips Petroleum Co., P.O. Box 968, Phillips, Tex. 79071;

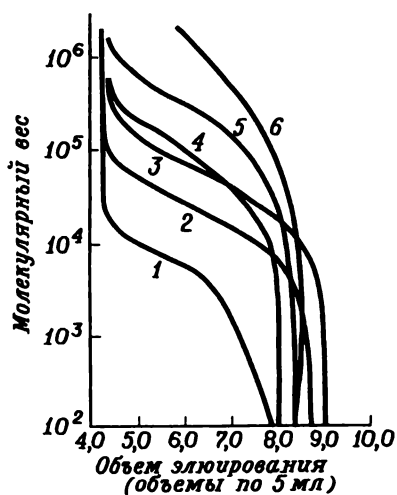
3 – National Bureau of Standards, Washington, D.C., 20234;

4 – Arco Laboratories Inc., P.O. Box 686, Joliet, Ill., 60434.

Свойства некоторых неподвижных фаз, выпускаемых промышленностью, приведены в табл. 5.2, а в табл. 5.3 приведен список полимерных стандартов, выпускаемых промышленностью.

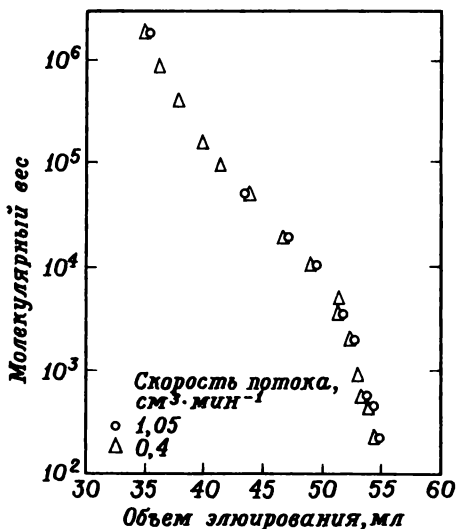
5.4.1. Неорганические неподвижные фазы

Когда неподвижные фазы из пористого стекла и двуокиси кремния были впервые введены в употребление, многие хроматографисты считали, что эти неподвижные фазы заменяют органические гели при фракционировании полимеров с высоким молекулярным весом. Пористое стекло и двуокись кремния можно было получить в виде фракций



Р и с. 5.4. Зависимость между молекулярным весом и объемом элюирования для различных типов порасила (растворенные вещества: полистиролы; подвижная фаза: толуол [17].

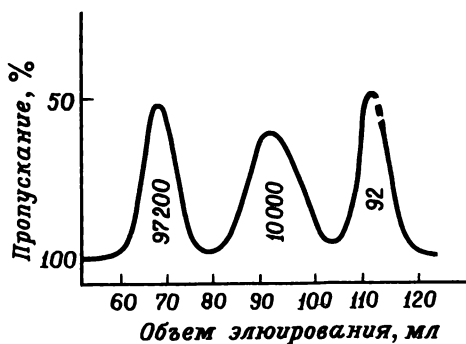
Диаметры пор в порасиле, Å:
 1 — 100; 2 — 100 — 200; 3 — 200 — 400;
 4 — 400 — 800; 5 — 800 — 1500;
 6 — 1500.



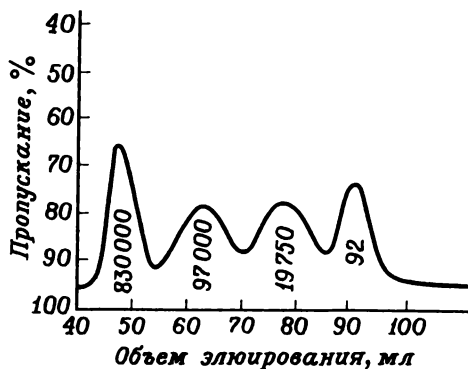
Р и с. 5.5. Зависимость между молекулярным весом и объемом элюирования для пористого стекла с широким распределением пор по размерам (растворенные вещества: полистиролы; подвижная фаза: толуол [18].

с достаточно точно контролируемым размером пор, пригодных для фракционирования высокомолекулярных соединений. Поскольку эти фазы не набухали, ими легко было набивать колонки и можно было менять растворители, не оказывая большого воздействия на эффективность колонки; кроме того, указанные фазы устойчивы при высоких

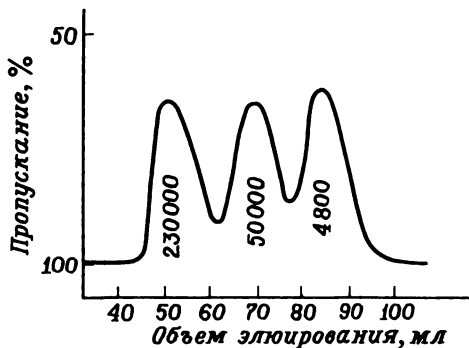
Р и с. 5.6. Разделение толуола и полистиролов на меркогеле Si 500 (подвижная фаза: хлороформ) [19].



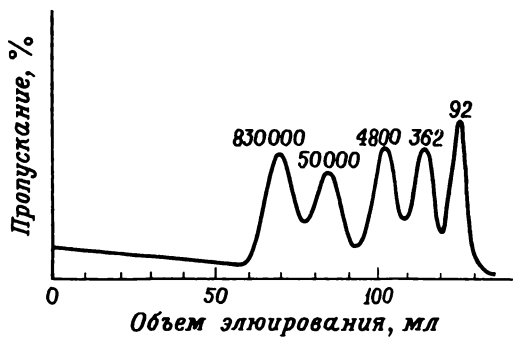
Р и с. 5.7. Разделение толуола и полистиролов на меркогеле Si 500 (подвижная фаза: хлороформ) [19].



Р и с. 5.8. Разделение полистиролов на меркогеле Si 1000 (подвижная фаза: хлороформ) [19].



Р и с. 5.9. Разделение толуола, полистиролов и олигофениленов на меркогеле 1 000 000 (подвижная фаза: тетрагидрофуран) [19].



температурах. К сожалению, ВЭТТ заполненных этими веществами колонок обычно выше, чем у колонок, заполненных гелями полистиролдивинилбензола. К тому же и пористое стекло и двуокись кремния часто дают нежелательные адсорбционные эффекты, и перед употреблением их необходимо дезактивировать. Шихта из пористых стекол была введена Халлером /14/, а также Муром и Аррингтоном /8/. В своей следующей работе /15/ Халлер оценил возможности использования такой шихты. Описание свойств пористой двуокиси кремния можно найти в статье де Врие и др. /16/.

На рис. 5.4 показаны калибровочные кривые для колонок длиной около 1,2 м, заполненных различными сортами порасила с частицами размером 105–125 мкм /17/. На рис. 5.5 показана подобная кривая, полученная для колонки длиной 1,6 м, заполненной обработанным гексаметилдисилазаном пористым стеклом с широким распределением пор по размерам (биоглас BRX 85001) и частицами размером 125–150 мкм. Очень похожая кривая получена при объединении колонок, содержащих неподвижные фазы с узким распределением пор по размерам: биоглас 200, 500, 1000 и 1500 /18/.

На рис. 5.6 – 5.9 показано разделение полистирола, полученное на различных крупнопористых меркогелях (силикагелях). Колонки длиной 1 м были заполнены фракцией 50–200 мкм, и эффективность их равнялась примерно 1000 теоретических тарелок на метр. В качестве подвижной фазы был использован хлороформ, детектирование проводилось УФ-детектором; такое же хорошее разделение было получено при использовании бензола, однако в случае тетрагидрофурана наблюдалось образование хвоста. Некоторые полимеры необратимо адсорбировались силикагелем.

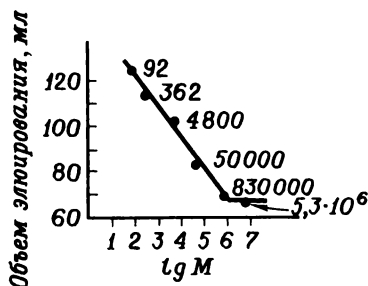
5.4.2. Алкилированные шитые декстраны

В большинстве работ, в которых рассматривается разделение в водных растворах, в качестве неподвижной фазы использовались шитые декстраны, выпускаемые промышленностью под названием "сефадексы". Если большинство гидроксильных групп алкилировано, сефадекс становится более липофильным и должен набухать в некоторых полярных растворителях. Продукт алкилирования сефадекса G25 известен как сефадекс LH20. Предел ситового исключения для этого продукта не достигает 5000, поэтому он пригоден лишь для фракционирования низкомолекулярных соединений. Сефадекс LH20 проявляет адсорбционные свойства по отношению к ароматическим соединениям и при использовании хлороформа в качестве подвижной фазы адсорбирует вещества, содержащие гидроксильные и карбоксильные группы. Сефадекс LH20 применяется для отделения, например, полиядерных ароматических соединений и циклоалканов от алканов /20/. При ситовом разделении небольших молекул адсорбционные свойства сефа-

дексов могут служить помехой, поэтому в этих случаях предпочтительнее использовать полистирол-дивинилбензолные гели с низким пределом ситового исключения.

5.4.3. Поливинилацетатные гели

Эти липофильные гели, известные под названием меркогель OR (Merckogel), получают сополимеризацией винилацетата и дивинилового эфира бутандиола-1,4 или дивиниловых эфиров дикарбоновых кислот /19/. Образцы с пределом ситового исключения вплоть до 5000 являются однородными сшитыми полимерами; гели с большими порами получают полимеризацией в присутствии инертного разбавителя. Даже гели с высоким пределом ситового исключения значительно набухают в органических растворителях, и это может быть причиной линейного характера зависимости логарифма молекулярного веса от объема элюирования (рис. 5.10). Набухшие гели становятся жесткими, и их можно использовать для заполнения колонок, работающих как под давлением, так и без него.



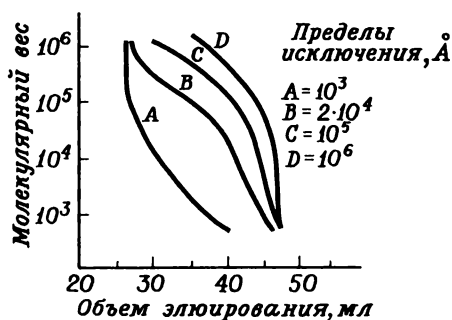
Р и с. 5.10. Логарифмическая зависимость объема элюирования от молекулярного веса для меркогеля OR 1 000 000 (растворенные вещества: толуол, полистиролы, олигофенилены) [19].

5.4.4. Полистирол-дивинилбензолные гели

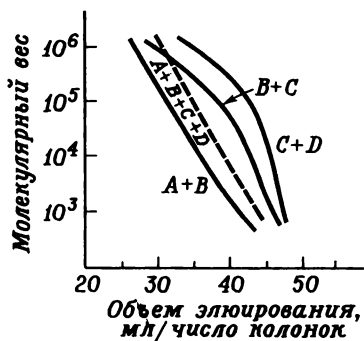
Гели, приготовленные из полистирола, сшитого дивинилбензолом, были исследованы Грином и Ваганом /21/. Эти авторы показали, что на таких гелях можно фракционировать полистиролы. Если путем уменьшения содержания дивинилбензола пористость гелей увеличивают, то они значительно набухают и становятся слишком мягкими, чтобы их можно было использовать в колонках. Исследователи, работающие в области ионного обмена, обнаружили, что, если проводить полимеризацию в присутствии определенных разбавителей, можно приготовить пористые жесткие полистирол-дивинилбензолные гели.

Если разбавитель не является растворителем для данного полимера, получают очень пористые гели, в то время как при использовании хороших растворителей, таких, как толуол, пористость полученного геля намного меньше. Меняя соотношение растворителя и нерастворителя, можно получить целый ряд гелей различной пористости. При большом содержании дивинилбензола образуются жесткие гели, слабо набухающие в органических растворителях.

Получают гели методом суспензионной полимеризации, при этом образуются приблизительно сферические частицы и можно получить различные фракции. Такие частицы можно использовать при достаточно высоких давлениях, так как они не уплотняются и сохраняют устойчивость в отсутствие воздуха вплоть до 150°C . Они практически не проявляют никаких адсорбционных свойств. Чтобы получить высокоэффективную колонку, ее следует заполнять при высоком давлении; с изменением подвижной фазы, очевидно, должны меняться как калибровочная кривая, так и эффективность колонки.



Р и с. 5.11. Соотношение между молекулярным весом и объемом элюирования для стирол-дивинилбензолных гелей (растворенные вещества: полистиролы; подвижная фаза: тетрагидрофуран) [22].



Р и с. 5.12. Соотношение между молекулярным весом и объемом элюирования для серии колонок, указанных на рис. 5.11 [22].

С неподвижными фазами указанного типа можно использовать самые различные органические растворители; выбор последнего обычно определяется растворимостью пробы и типом используемого детектора. В случае рефрактометрического детектора различие в показателях преломления пробы и растворителя должно быть как можно больше. Для опытов, проводимых при комнатной температуре, часто используют тетрагидрофуран, так как он является прекрасным раство-

рителем и имеет очень низкий показатель преломления. *o*-Дихлорбензол и 1,2,4-трихлорбензол часто применяют в качестве растворителей при высоких температурах; их показатель преломления выше, чем у полиэтилена или полипропилена.

Выпускаемые промышленностью гели обычно классифицируют по их верхнему пределу проницаемости в ангстремах. Его можно перевести в обычные единицы молекулярного веса полистирола, умножив на 40. Наименее пористый гель имеет предел проницаемости, равный 45 Å, и подходит для разделения вещества с молекулярным весом меньше 1000. Рис. 5.11 и 5.12, полученные Мейерхоффом /22/, показывают соотношения между объемом элюирования и молекулярным весом для одиночных и сборных колонок, заполненных полистирол-дивинилбензольными гелями различной пористости. Как следует из приведенных рисунков, четыре объединенные колонки дают приблизительно линейную зависимость логарифма молекулярного веса от объема элюирования в широком интервале молекулярных весов.

ПРИЛОЖЕНИЕ. ПРИМЕНЕНИЕ СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

1. Высокомолекулярные соединения

Обсудим использование ситовой хроматографии отдельно для разделения веществ с низким и высоким молекулярным весом.

Прежде чем перейти к обсуждению вопросов, связанных с разделением высокомолекулярных соединений, рассмотрим существующие соотношения между вязкостью и молекулярным весом.

Если η — вязкость разбавленного раствора полимера и η_0 — вязкость растворителя, то удельная вязкость η_{sp} равна $(\eta - \eta_0)/\eta_0$. Если c — концентрация раствора полимера, то характеристическая вязкость $[\eta]$ определяется как предел отношения η_{sp}/c при $c \rightarrow 0$.

Соотношение между вязкостью и молекулярным весом дано эмпирическим уравнением Марка — Хувинка

$$[\eta] = kM^a, \quad (5.3)$$

где k и a — константы для данной системы растворитель — полимер при заданной температуре, M — средневязкостный молекулярный вес. Величины k и a должны определяться экспериментально (см. работу /23/).

Эйнштейн вывел следующее уравнение для вязкости разбавленной суспензии твердых сфер:

$$\mu_{sp}/\mu_0 = 1 + \frac{2}{3}\phi, \quad (5.4)$$

где ϕ — доля общего объема, занятого сферами. Используя это уравнение, можно показать, что для полимеров

$$[\eta] \propto \nu/M, \quad (5.5)$$

где M – молекулярный вес, v – объем эквивалентной сферы, т.е. сферы, объем которой увеличил бы вязкость растворителя таким же образом, как молекула полимера.

Среднечисловой, средневесовой и средневязкостный молекулярные веса определяются следующим образом:

$$\text{среднечисловой: } M_n = (\sum N_i M_i) / \sum N_i,$$

$$\text{средневесовой: } M_w = (\sum N_i M_i^2) / \sum N_i M_i,$$

$$\text{средневязкостный: } M_v = [(\sum N_i M_i^{1+a}) / \sum N_i M_i]^{1/a}.$$

Здесь N_i – число молекул с молекулярным весом M_i , a – показатель степени в уравнении Марка – Хувинка. Значение \bar{M}_v ближе к \bar{M}_w , чем \bar{M}_n , и идентично \bar{M}_w , если $a = 1$.

До введения ситовой хроматографии определение молекулярно-весового распределения полимеров проводилось путем дробного растворения или дробного осаждения и требовало длительного времени. При этом необходимо было найти подходящие экспериментальные условия для определения каждого вида полимеров, а также определить молекулярные веса фракций. Ситовая хроматография позволяет получать информацию намного быстрее и применима к любому полимеру, способному растворяться. Следует отметить, что ситовая хроматография – это метод разделения, сам по себе он не дает никакой информации о молекулярных весах; при разделении указанным способом необходимо провести стандартизацию по образцам, молекулярные веса которых были определены абсолютными методами.

Во многих случаях достаточная информация может быть получена при сравнении хроматограмм различных образцов, но если необходимо определить молекулярновесовое распределение, то прибор следует прокалибровать, т.е. связать сигнал детектора с концентрацией и объемом элюирования с молекулярным весом.

Почти всегда в качестве детекторов используют дифференциальные рефрактометры, так как, если молекулярный вес больше 10 000 показатель преломления не зависит от молекулярного веса и сигнал на выходе прямо пропорционален концентрации. Для проб, содержащих значительные количества веществ с молекулярным весом меньше 10 000, дифференциальный рефрактометр должен быть откалиброван. Объем элюирования может быть связан с молекулярным весом несколькими способами:

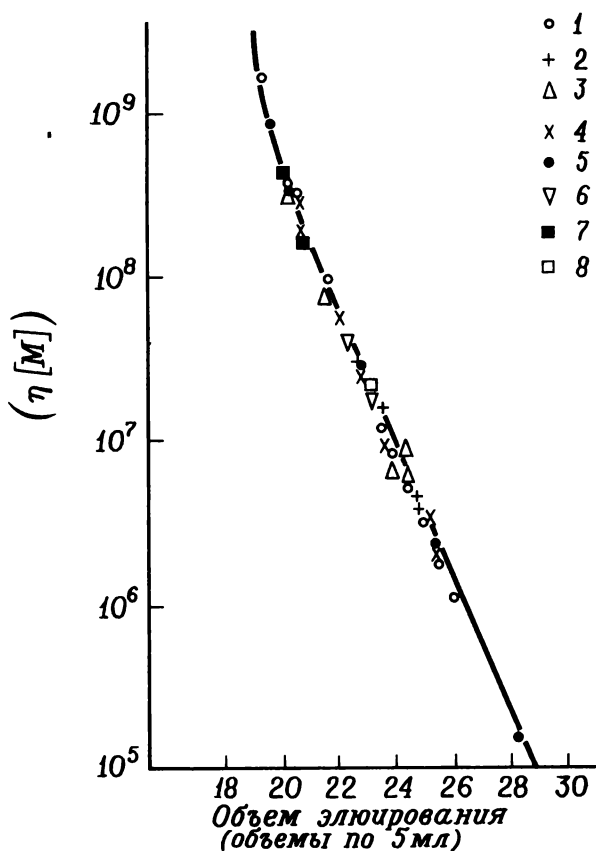
а. Полимер разделяют на узкие фракции и определяют молекулярный вес общепринятыми методами. После этого определяют объемы элюирования фракций. Поскольку каждому виду полимера должна соответствовать своя калибровочная кривая, то этот метод имеет смысл использовать только в том случае, когда необходимо исследовать большое количество проб немногих типов полимеров.

б. Можно использовать универсальный калибровочный метод. Бено и др. /24/ считают, что важным параметром при определении объема элюирования молекулы является гидродинамический объем. В соответствии с уравнением (5.5) он должен, по-видимому, быть пропорционален $[\eta]M$. Бено и сотрудники, а позднее и другие исследователи показали, что (рис. 5.13) многие типы полимеров имеют один общий график зависимости $\log(M[\eta])$ от объема элюирования. При использовании этого метода калибровки должны быть известны коэффициенты уравнения Марка - Хувинка. Обзор указанного метода можно найти в работе /25/.

в. Первоначально предполагалось, что объем элюирования полимера зависит от длины вытянутой цепи молекулы, т.е. длины молекулы полимера при ее полном вытягивании, рассчитанной по данным о валентных углах и длинах связей.

После того как соотношение между логарифмом длины вытянутой цепи и объемом элюирования установлено для одного полимера, его можно применить к другим полимерам путем умножения длины вытянутой цепи на теоретически вычисленное значение молекулярного веса, приходящегося на единицу длины цепи, известное как Q -фактор. Этот метод является особенно привлекательным, поскольку калибровочная кривая может быть получена при использовании доступных, хорошо охарактеризованных образцов полистирола с узким молекулярновесовым распределением. Теперь стало известно, что полученное расчетным путем значение Q может значительно отличаться от фактического, но все же метод этот можно применять, если значение Q определяется экспериментально, путем сравнения найденного из распределения среднечислового, средневесового или средневязкостного молекулярного веса, рассчитанного в значениях длины вытянутой цепи, с установленным экспериментально методом осмометрии, светорассеяния или вискозиметрии. Коэффициенты для расчета полной длины цепи даны в работе Хендриксона /26/. Этот метод удобен, когда имеют дело с большим числом различных видов проб (подробно см. в работе /27/).

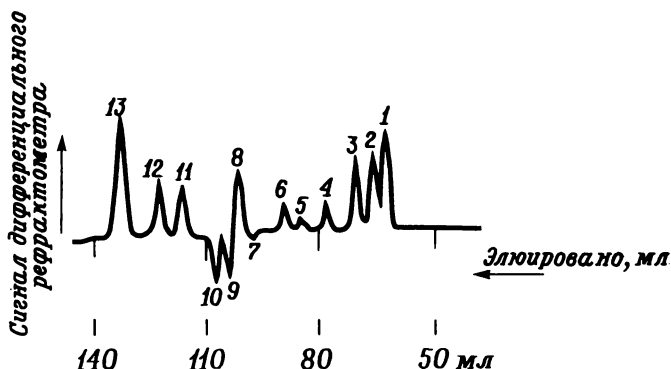
Кривая элюирования, получаемая в ситовой хроматографии, искажается размыванием пика. Это искажение уменьшается с увеличением эффективности колонки, и оно менее важно для образцов с широким молекулярновесовым распределением; ошибки в определении среднего молекулярного веса колеблются от 2 до 10%. Можно ввести поправку на этот эффект, но это сделать не просто. Большинство опубликованных методов внесения поправок требуют сложных расчетов и хорошей воспроизводимости и пригодны отнюдь не для всех образцов. Обзор методов внесения поправок можно найти в работе /28/.



Р и с. 5.13. Зависимость объема элюирования от $M[\eta]$ для различных полимеров. Неподвижная фаза: стирол-дивинилбензолные гели с молекулярным весом 10^6 , 10^5 , 10^4 и $2 \cdot 10^2$; подвижная фаза: тетрагидрофуран [24].
 1 – гребнеподобный полистирол; 2 – звездообразный полистирол; 3 – гетеропривитой сополимер; 4 – полиметилметакрилат; 5 – поливинилхлорид; 6 – привитой сополимер полистирола и полиметилметакрилата; 7 – полифенилсилоксан; 8 – полибутадиен.

2. Низкомолекулярные соединения

Хотя в основном ситовую хроматографию применяют для разделения полимеров, ее также используют для разделения низкомолекулярных соединений. Часто с помощью газовой хроматографии можно получить лучшее разделение, но у ситовой хроматографии есть два



Р и с. 5.14. Разделительная способность колонки длиной 3,6 м, заполненной стирол-дивинилбензольным гелем (размер частиц 40 Å) [26].

1 — полипропиленгликоль 400, 2 — *n*-октадециловый спирт, 3 — *n*-додециловый эфир; 4 — *n*-октиловый эфир; 5 — *n*-додекан, 6 — гептанол, 7 — *n*-гептан, 8 — 1,4-дихлорбутан, 9 — *n*-пентан; 10 — этиловый эфир; 11 — иодистый этил; 12 — иодистый метил; 13 — сероуглерод.

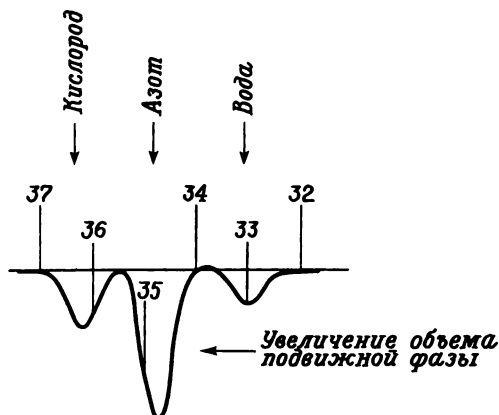
преимущества: разделение может производиться при комнатной температуре и не существует нижнего и верхнего пределов для молекулярного веса растворенного вещества. На рис. 5.14 показано разделение Хендриксоном /26/ 13 соединений на колонке длиной 3,6 м, заполненной стирол-дивинилбензольным гелем с верхним пределом проницаемости 40 Å.

Иногда в низкомолекулярной области находят пики, обусловленные наличием примесей в растворителе. В тех случаях, когда в качестве растворителя используется тетрагидрофуран, наблюдают пики кислорода, азота и воды /29/ (рис. 5.15). Появление указанных пиков вызвано тем, что содержание воды и воздуха в вводимой пробе раствора отличается от содержания в основном объеме тетрагидрофурана.

Для низкомолекулярных веществ объем элюирования является функцией молярного объема, причем наблюдается линейная за-

висимость логарифма молярного объема от объема элюирования.

Некоторые полярные вещества в полярных растворителях элюируются раньше, чем следовало бы ожидать, исходя из величины их



Р и с. 5.15. Пики, появление которых обусловлено наличием примесей в подвижной фазе (тетрагидрофуране). Детектор — дифференциальный рефрактометр [29].

молярных объемов. По-видимому, это обусловлено ассоциацией молекул растворенного вещества с молекулами растворителя; для спиртов и кислот этот эффект наблюдается в тетрагидрофуране, а в менее полярном растворителе, таком, как *о*-дихлорбензол, отсутствует.

Список литературы

1. Giddings J.C., Anal. Chem., **39**, 1027 (1967).
2. Moore J.C., J. Polymer Sci., **A 22**, 835 (1964).
3. Yau W.W., Malone C.P., Suchan H.L., Preprints, Division of Petroleum Chemistry, Am. Chem. Soc., **15**, A63 (1970).
4. Ginsberg B.Z., Cohen D., Trans. Faraday Soc., **60**, 185 (1964).
5. Porath J., Pure Appl. Chem., **6**, 233 (1963).
6. Laurent T.C., Killander J., J. Chromatog., **14**, 317 (1964).
7. Ogston A.G., Trans. Faraday Soc., **54**, 1754 (1958).
8. Moore J.C., Arrington M.C., Preprints, Third International Seminar on Gel Permeation Chromatography, Geneva, 1966.
9. De Vries A.J., Le Page M., Beau R., Guillemin C.L., Anal. Chem., **39**, 935 (1968).
10. Casassa E.E., Polymor Letters, **5**, 773 (1967).

11. *Giddings J.C., Kucera E., Russell C.P., Myers M.N.*, J. Phys. Chem., **72**, 4397 (1968).
12. *Casassa E. F., Tagami Y.*, Macromolecules, **2**, 14 (1969).
13. *Kwok J., Snyder L.R.*, Anal. Chem., **40**, 118 (1968).
14. *Haller W.J.*, J. Chem. Phys., **42**, 686 (1965).
15. *Haller W.J.*, Nature, **206**, 693 (1965).
16. *De Vries A.J., Le Page M., Beau R.*, J. Polymer Sci., **C 21**, 119 (1968).
17. *Kelley R.N., Billmeyer F.W., Jr.*, Preprints, Division of Petroleum Chemistry, Am. Chem. Soc., **15**, A157 (1970).
18. *Cooper A.R., Cain J.H., Barrall E.M., Johnson J.F.*, Preprints, Division of Petroleum Chemistry, Am. Chem. Soc., **15**, A95 (1970).
19. *Heitz W., Klatyk K., Krafczyk F., Pfitzner K., Randau D.*, in "Proc. Seventh International Seminar on GPC, Monte Carlo", 1969, p. 214.
20. *Mair B.J., Huang P.T.R., Ruberto R.G.*, Anal. Chem., **39**, 838 (1967).
21. *Green J.H.S., Vaughan M.F.*, Chem. Ind., **1958**, 829.
22. *Meyerhoff G.*, J. Polymer Sci., **C 21**, 31 (1958).
23. *Brandrup J., Immergut E.H.*, (eds), Polymer Handbook, Interscience Publishers, New York, 1966.
24. *Benoit H., Rempp P., Grubisic Z.*, Polymer Letters, **5**, 753 (1967).
25. *Coll H., Gilding D.K.*, J. Polymer Sci., **A-2**, **8**, 89 (1970).
26. *Hendrickson J. G.*, Anal. Chem., **40**, 49 (1968).
27. *Harmon D.J.*, J. Polymer Sci., **C**, **8**, 243 (1965).
28. *Duerksen J.H.*, Preprints, Division of Petroleum Chemistry, Am. Chem. Soc., **15**, A47 (1970).
29. *Alliet D.*, J. Polymer Sci., **A-1**, **5**, 1783 (1967).

Список дополнительной литературы

- Determann H.*, Gel Chromatography, Springer-Verlag, Berlin, 1968. Теория и практика ситовой хроматографии в водных и неводных растворах.
- Cazes J.*, J. Chem. Ed., **47**, A461, A505 (1970). Хорошее введение в практику ситовой хроматографии в неводных растворах.
- Altgelt K.H.*, Advan. Chromatog., **7**, 3 — 46 (1968). Обзор теории ситовой хроматографии, в настоящее время довольно устаревшей.
- Peaker F.W.*, in "Chromatography", Browning D.R., ed., McGraw-Hill, London, 1969. Старая статья о ситовой хроматографии в неводных растворах.

Глава 6

ХРОМАТОГРАФИЯ В ТОНКОМ СЛОЕ

6.1. ВВЕДЕНИЕ

Считается, что метод хроматографии в тонком слое (ТСХ) открыт Измайловым и Шрайбером /1/, которые в 1938 г. разделили растительные экстракты на слоях адсорбента, нанесенных на покровные стекла микроскопа (суспензия адсорбента в воде равномерно распределялась по стеклу и затем высушивалась). Нанесенное на слой адсорбента пятно анализируемого вещества разделялось на две концентрические зоны при введении в центр пятна определенных растворов.

В 1944 г. Консен и др. /2/ разработали метод хроматографии на бумаге, и в последующие 12 лет было опубликовано свыше 10 000 работ, посвященных этой теме. Хотя в хроматографии на бумаге, так же как и в распределительной хроматографии, используется различие в распределении гидрофильных веществ между подвижной водной фазой и водой, удерживаемой целлюлозным носителем, в современной ТСХ применяются специальные методы и специальная аппаратура.

В начале 50-х годов Кишнер и сотр. /3-6/ предпринимали попытки распространить этот вид хроматографии на липофильные вещества, например пропитывая бумагу из стекловолокна такими адсорбентами, как силикагель или окись алюминия, или нанося адсорбенты на полоски стекла. Однако только в 1956 г. Шталь /7,8/ установил, что для того, чтобы сделать метод общепринятым, необходимо стандартизировать операции, адсорбенты и оборудование. Результатом его усилий было появление в продаже в 1958 г. стандартного оборудования, состоящего из прибора для нанесения слоя, стеклянных пластинок, служащих подложкой для слоя, камеры для проявления хроматограмм и адсорбентов. История хроматографии в тонком слое излагается в работе /9/, включающей переводы оригинальных статей Измайлова и Шрайбера /1/ и Шталь /8/.

Начиная с 1960 г. число публикаций, посвященных использованию хроматографии в тонком слое, в том числе и в области биохимии, фармацевтической химии, синтетической органической химии и промышленного органического анализа, в среднем превысило 1000 в год. Было написано большое число обзоров и несколько моногра-

фий; монографии /57–58/ охватывают большинство работ, опубликованных до 1966 г. Начиная с этого времени, основные успехи были достигнуты в улучшении воспроизводимости метода и его использования в количественном анализе. К 1964 г. ТСХ получила официальное признание и была включена в качестве стандартного метода в некоторые фармакопеи /8/.

Поскольку в данной главе рассматриваются в основном липофильные вещества в неводных растворах, то мы не будем особо останавливаться на методике хроматографии на бумаге (или ее более современного аналога, использующего стекла, покрытые целлюлозой), для нормальной и обращенной распределительной, ионообменной, ситовой хроматографии, а также на разделении неорганических ионов. Достаточно сказать, что описанные аппаратура и методика в общем применимы во всех методах хроматографии в тонком слое, которые различаются только механизмом разделения. Мы не намеревались дать обзор всех работ в этой области (см. список дополнительной литературы). Вместо этого мы опишем методику адсорбционной хроматографии в тонком слое, широко используемую в лаборатории авторов с 1961 г., и обсудим ее некоторые усовершенствования.

6.2. ОСНОВЫ МЕТОДА

Хроматография в тонком слое является простым и быстрым методом разделения, использующим недорогое, портативное оборудование, и поэтому особенно привлекательным для тех лабораторий, которые имеют небольшой бюджет; метод имеет очень широкие возможности. Его следует применять в тех случаях, когда необходимо исследовать большое число образцов, компоненты которых легко отделяемы друг от друга.

Эффективность обычных хроматографических разделений в тонких слоях редко превышает 1000 теоретических тарелок. Разделения могут быть улучшены посредством: 1) модифицирования неподвижной фазы с целью увеличения селективности, 2) путем модификации жидкой фазы, например введением градиентного элюирования, 3) в результате увеличения числа проявлений (одномерные или двумерные) или 4) снижения температуры. Однако при этом методика анализа усложняется, а длительность анализа возрастает. Поэтому сложные разделения предпочтительно проводить на высокоэффективных колонках, в которых легче контролировать условия получения хроматограмм.

В ТСХ используют стеклянные, металлические или пластмассовые пластинки, покрытые тонким слоем неподвижной фазы, обычно толщиной 100–300 мкм. Образцы, как правило, 2–10 мкл наносят в виде 0,1–1%-ных растворов на слой вблизи основания пластинки. Пластинку помещают в камеру, содержащую несколько миллилитров соответствующей жидкой подвижной фазы, которая перемешается по

слою под действием капиллярных сил. При этом компоненты образца перемещаются через слой с различными скоростями, зависящими от адсорбционных коэффициентов компонентов смеси. Проявление заканчивают, удаляя пластинку из камеры и испаряя подвижную фазу. Положение разделенных веществ, если они не окрашены, обычно определяют, рассматривая хроматограмму в ультрафиолетовом свете или опрыскивая ее окрашивающими реагентами. Положение пятна разделенного вещества описывается посредством измерения его R_F :

$$R_F = \frac{\text{Расстояние, пройденное веществом от точки старта}}{\text{Расстояние, пройденное подвижной фазой от точки старта}}.$$

В соответствии с определением R_F всех адсорбированных веществ меньше 1,00. Для удобства введена величина hR_F , причем $hR_F = 100 R_F$.

Величина R_F растворенного вещества связана с его адсорбционным коэффициентом K выражением

$$R_F = \frac{1}{1 + (W_a / V_s) K},$$

где W_a и V_s соответствуют количеству неподвижной и подвижной фаз. При выводе этого выражения предполагается, что отношение W_a / V_s остается постоянным на всей проявляемой пластинке, подвижная фаза имеет одинаковый состав и перемещается только благодаря капиллярному мигрированию, т.е. адсорбция паров растворителя в неподвижной фазе отсутствует. Практически эти условия выполняются лучше всего в тех случаях, когда проявление проводится в камерах, представляющих собой слой, зажатый между двумя пластинками, и когда подвижная фаза может переливаться через край пластинки (см. далее). Если такое переливание не допускается, то значение R_F лучше описывается следующим выражением:

$$1,1R_F = \frac{1}{1 + (W_a / V_s) K}.$$

Другим методом измерения положения пятна является отнесение его к положению хроматографированного одновременно вещества сравнения X ("свидетеля"). Положение вещества тогда определяется как

$$R_X = \frac{\text{Расстояние, пройденное растворенным веществом от точки старта}}{\text{Расстояние, пройденное веществом сравнения от точки старта}}.$$

В отличие от R_F значения R_X могут быть больше 1.

Таблицы значений R_F , собранных из работ различных авторов, регулярно публикуются в "Journal of Chromatography".

Количественный анализ методом ТСХ выполняется посредством хроматографирования стандартных растворов исследуемых компонентов вместе с исследуемым образцом. Количество материала в пятне связывают с площадью и интенсивностью выявленного пятна; стандарты и образцы можно сравнить визуально или измерить с помощью, например, прямой спектрофотометрии, денситометрии и т.д.

Материал пятна можно вымыть из неподвижной фазы и использовать для дальнейшего исследования. Его можно количественно измерить спектрофотометрически. Неизвестные вещества идентифицируют методом ИК-спектроскопии или масс-спектрометрии или подвергают дальнейшему разделению, например с помощью газовой хроматографии. Для этих целей величины образцов могут быть увеличены путем использования слоев большей толщины (до 2 мм), нанесением образца в виде полосы и применением более широких пластинок (до 1 м).

6.3. НЕПОДВИЖНАЯ ФАЗА

В принципе в ТСХ можно применять все неподвижные фазы, используемые в хроматографии в колонках. Хотя наиболее широко в ТСХ в качестве неподвижных фаз используются адсорбенты, чаще всего силикагель и несколько реже окись алюминия, известны многочисленные примеры применения в тонких слоях принципов нормального распределения (целлюлоза), обращенного распределения фаз (кизельгур, пропитанный высококипящими неполярными органическими жидкостями), а также ионообменных и ситовых неподвижных фаз.

Адсорбенты для ТСХ выпускаются промышленностью (см. /57/). Свойства этих адсорбентов рассмотрены в гл. 3. Как было отмечено, свойства одних и тех же адсорбентов, выпускаемых разными фирмами, значительно отличаются. Поэтому хроматографистам следует пользоваться адсорбентами одной фирмы и стандартизировать свойства адсорбента. Это особенно важно в тех случаях, когда ТСХ используется совместно с колоночной хроматографией.

Адсорбенты для ТСХ получают в виде частиц с диаметром 1–40 мкм. Они могут содержать добавки связующего (5–20% гипса или 2–5% крахмала), которое добавляют с тем, чтобы получить однородный прочный слой, а также добавки флуоресцентного индикатора (например, силиката цинка), вводимые для детектирования таких веществ, которые гасят флуоресценцию при просматривании в ультрафиолетовом свете. Поверхностные свойства адсорбентов могут быть изменены с тем, чтобы придать им специальные адсорбционные характеристики (см. гл. 3).

Многие адсорбенты содержат неорганические примеси, в частности железа, а также экстрагируемые растворителями органические примеси, которые мешают идентификации разделенных веществ, элюированных с пластинок. Установлено, что силикагели Н, HF254 или HR (Merck) удовлетворяют основным требованиям, предъявляемым к адсорбентам общего назначения, применяемым как в хроматографии в тонком слое, так и в высокоэффективной хроматографии в колонках. Эти адсорбенты не содержат связующего, свободны от органических материалов, которые могут быть экстрагированы растворителями, и дают однородное покрытие пластинок, которое может быть успешно использовано при работе с большинством органических растворителей. Силикагель HF254 содержит неорганический флуоресцентный индикатор, позволяющий при просматривании пластинок, облучаемых светом длиной волны 254 нм, детектировать поглощающие флуоресценцию при этой длине волны разделенные вещества в виде неярких розовато-лиловых пятен на зеленом фоне. Силикагель HR является адсорбентом высокой чистоты, и его в высшей степени целесообразно использовать в тех случаях, когда разделенные вещества должны быть вымыты с адсорбента и собраны для дальнейшей идентификации.

Хотя адсорбенты, содержащие связующее, дают более прочные слои, адсорбционные свойства таких адсорбентов изменены, проявление пластинок с такими адсорбентами длится дольше, а в случае добавления гипса слои должны быть нанесены прежде, чем произойдет дегидратация гипса, т.е. в течение 4 мин с момента приготовления суспензии.

6.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПЛАСТИНОК ДЛЯ ТСХ

6.4.1. Выбор подложки

Пластинки для хроматографии в тонком слое (ТСХ-пластинки) состоят из тонкого слоя адсорбента (толщиной 0,1–10 мм), распределенного по подложке – пластинке из стекла, алюминиевой фольги или пластмассы. В продаже также имеется бумага из стекловолокна, пропитанная адсорбентом, однако она довольно хрупкая.

Для приготовления слоев в лабораторных условиях почти всегда используют стеклянные пластинки толщиной 2–4 мм. Стекло имеет то преимущество, что его можно легко очистить, повторно использовать, работая с ним, можно применять самые различные растворители и обнаруживающие реагенты, включая наиболее коррозионноактивные. Стандартные размеры пластинок: 20 x 20, 10 x 20 и 5 x 20 см, хотя можно приобрести также пластинки шириной до 1 м. Если проявленная хроматограмма должна быть подвергнута нагреванию при высоких температурах (> 150°C) как, например, при выявлении хро-

матограммы методом обугливания, то можно использовать боросиликатное стекло. И использованные пластинки очищают, промывая текущей водой, погружают на 24 ч в емкость с дистиллированной водой, содержащей 1%-ный водный раствор детергента, после чего еще раз промывают дистиллированной водой и высушивают.

6.4.2. Приготовление суспензии

Адсорбент наносится на пластинку в виде водной суспензии. Чтобы покрыть 5 пластинок размером 20 x 20 см или 12 пластинок размером 20 x 5 см силикагелем с толщиной влажного слоя 0,25 мм, 27,5 г силикагеля Н, HF254 или HR тщательно в течение 1 мин встряхивают с 60 мл воды в закрытой пробкой конической колбе емкостью 250 мл. Для покрытия того же самого количества пластинок влажным слоем толщиной 0,75 мм требуется 80 г адсорбента и 180 мл воды. Суспензия может сохраняться неизменной в хорошо закрытой склянке. При использовании адсорбентов из других источников следует пользоваться рекомендациями изготовителей. Адсорбенты, содержащие в качестве связующего гипс, должны быть нанесены в течение 4 мин с момента добавления воды, так как по истечении этого времени гипс начнет "схватываться".

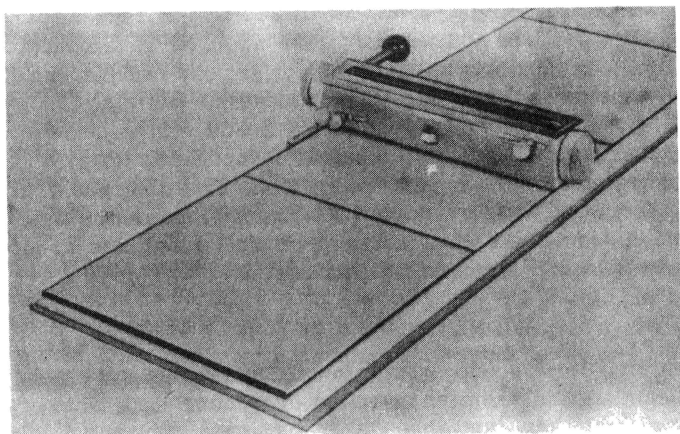
6.4.3. Нанесение слоя на пластинки

Известны четыре основных способа нанесения слоя на пластинки: а) наливают необходимое количество суспензии на пластинку и разравнивают слой, наклоняя пластинку в разные стороны или распределяя его с помощью линейки или стеклянной палочки; б) погружают пластинку в суспензию, вытаскивают и высушивают (см. раздел, посвященный выбору подвижной фазы), в) распыляют суспензию по пластинке с помощью воздушного распылителя; г) используют механическое распределяющее устройство. В последнем случае воспроизводимость толщины слоя намного лучше, чем в первых трех. Последний способ также намного удобнее, если требуется приготовить несколько пластинок. Шталь /57/ приводит список 156 фирм, выпускающих оборудование для ТСХ.

Механические устройства для нанесения слоев в основном бывают двух типов:

а. В приборе "по Киршнеру" пластинки последовательно вдвигаются под неподвижный лоток, содержащий суспензию. Один край лотка установлен над пластинкой так, что обеспечивает требуемую высоту влажного слоя. Имеется два варианта такого прибора: с ручным и механическим управлением. С помощью последнего удобнее наносить слои в тех случаях, когда в день расходуется более 20 пластинок.

б. В приборе для нанесения слоев "по Шталю" (рис. 6.1) содержащий суспензию лоток равномерно продвигают над серией пластинок, расположенных на пластмассовом шаблоне. Между одной стороной лотка и пластинами устанавливают такой зазор, чтобы толщина полученного слоя составляла 0–2 мм. С помощью этого простого устройства можно легко и быстро наносить слои адсорбентов. В лаборатории авторов оно используется уже более 10 лет. При переходе с одной пластинки на другую при нанесении слоя "по Шталю" может наблюдаться образование "гребня" из-за небольших различий в толщинах стекла. При использовании суспензий с указанным выше со-



Р и с. 6.1. Прибор для нанесения слоев и шаблон.

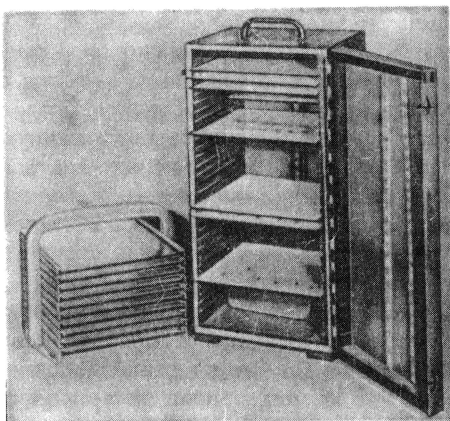
отношением адсорбента и воды (которое предусматривает несколько большее содержание воды, чем рекомендуют изготовители) было найдено, что "гребни" могут быть легко сняты осторожным постукиванием по шаблону сразу после нанесения слоя. В продаже имеется прибор такого же типа, пригодный для приготовления градиентных слоев двух неподвижных фаз X и Y , состав которых изменяется от чистой фазы X – на одном конце пластины до чистой фазы Y – на другом конце. Это позволяет выбирать оптимальный состав адсорбента для данного образца неподвижной фазы.

6.4.4. Высушивание и хранение пластинок

Свежепокрытые пластинки благодаря наличию на поверхности воды имеют блестящую отражающую поверхность. Такие пластинки оставляют на шаблоне до тех пор, пока вода не испарится и пока силикагель не станет тусклым и прозрачным. Если толщина слоя составляет 250 мкм, для этого требуется 15–30 мин; длительность вы-

держки возрастает в соответствии с толщиной слоя. По окончании выдержки пластинки помещают в металлический стеллаж для просушивания (рис. 6.2), который в свою очередь устанавливают на 60 мин в хорошо вентилируемую печь, где поддерживается температура 105–110°C. Стеллаж устанавливают так, чтобы пластинки находились в вертикальном положении. Высушенные пластинки помещают в деревянный ящик для хранения (рис. 6.2), содержащий силикагель, пропитанный индикатором влажности.

При рассмотрении в проходящем свете покрывающий пластинку слой должен быть равномерным, в нем не должно быть неровностей и комков адсорбента. Чтобы при работе с пластинкой избежать нарушения слоя, целесообразно удалить по краям пластинки полоску адсорбента в 4 мм с помощью большого и указательного пальцев.



Р и с. 6.2. Стеллаж для сушки и ящик для хранения пластинок.

6.4.5. Пластины с готовым слоем

В последние годы все больше выпускается пластинок с заранее нанесенным тонким слоем адсорбента (пластины с готовым слоем). В табл. 6.1 приведен список фирм, изготавливающих такие пластинки. Подложка может быть изготовлена в виде пластмассовых листов, металлической фольги, пропитанного стекловолокна, а также стеклянных пластинок. Пластины, покрытые слоем силикагеля, могут также содержать связующее вещество или флуоресцентный индикатор. Кроме того, изготавливаются пластинки, покрытые окисью алюминия, целлюлозой, полиамидными и поликарбонатными смолами.

Вместо того чтобы самим готовить пластинки, фотографировать их и затем очищать, можно взять готовую пластинку из пакета, а проявленную и расшифрованную хроматограмму сохранить в рабочем журнале или даже просто ее выбросить. Такой весьма заманчивый способ получил название "мгновенной хроматографии в тонком слое". Однако наряду с преимуществами этот способ имеет и недостатки:

а. В настоящее время стоимость пластинки с готовым слоем размером 20 x 20 см равна примерно 0,5 долл., в то время как при собственном изготовлении пластинка стоит 0,05 долл. Последняя вели-

чина отражает стоимость адсорбента и не включает стоимости многократно используемой стеклянной подложки и оборудования для нанесения слоя. С этой точки зрения высокая стоимость пластинок с готовым слоем оправдана только там, где очень высоки рабочие нагрузки. Время, необходимое для приготовления пяти пластинок размером 20 x 20 см, проведения анализа и записи окончательной хроматограммы, составляет примерно 1 ч.

б. Хроматографические свойства пластинок различных типов неодинаковы и отличаются от свойств самодельных пластинок. В табл. 6.1 сравниваются толщина слоя (которая определяет размеры разделяемого образца), природа связывающего и скорость анализа, определяемая временем, необходимым для того, чтобы толуол поднялся на высоту 10 см в С-камере (или "сэндвич-камере"), и значениями R_F для компонентов пробной смеси красителей при проявлении в толуоле. Приведенные данные показывают, что указанные величины могут значительно отличаться.

в. Рабочие характеристики различных типов пластинок с готовым слоем могут сильно отличаться. Авторы данной главы установили следующее: 1. Листы стекловолокна, пропитанного силикагелем, слоятся при использовании настолько сильно, что подавляющее большинство листов во взятом нами пакете было непригодно для использования; после проявления эти листы теряли жесткость и становились похожими на куски промокательной бумаги. 2. Слои, нанесенные на алюминиевую фольгу, необратимо деформируются даже при слабом нагревании в печи и становятся непригодными для употребления. 3. Слои, нанесенные на пластмассовые листы, обладают высокой прочностью; слои, связанные с помощью поливинилового спирта, прочнее, чем связанные с помощью крахмала, и на первых можно писать карандашом. Однако слои адсорбента при этом тонкие (примерно 100 мкм) и, следовательно, требуют использования малых образцов; пластмассовые подложки, как и подложки из алюминиевой фольги, имеют то преимущество, что с помощью ножниц им можно придать желаемую форму и их удобно сохранять в лабораторном журнале. 4. Свойства стеклянных пластинок с готовым слоем зависят от того, какая фирма их изготавливала. Пластины первой партии одной из фирм оказались непригодными для использования, так как еще до того, как с ними начали работать, большая часть адсорбента осыпалась. Полученная недавно партия оказалась лучше: у ряда пластинок были однородные слои силикагеля, прочно связанные со стеклянной подложкой, и с ними можно было работать без особых предосторожностей. Адсорбент с пластинок можно было удалить только соскабливанием острым концом шпателя, на слое можно было писать шариковой ручкой. Мы особенно рекомендуем пластики фирмы "E. Merck AG".

г. Некоторые обнаруживающие реагенты нельзя использовать с определенными типами пластинок с готовым слоем, так как эти реа-

генты вступают в реакцию с подложкой или связующим. Пластмассовые листы нельзя нагревать при температуре выше примерно 130°C, и, таким образом, обнаружение хроматограмм методом обугливания исключается.

д. Выбор пластинки с готовым слоем для разделения и выделения веществ, необходимых для спектроскопических исследований, ограничен из-за большого риска загрязнения посторонними органическими материалами. Это исключает возможность применения пластмассовых листов и всех адсорбентов, имеющих органические связующие. Разрешается использовать только абсолютно чистые адсорбенты.

6.4.6. Выводы

В заключение мы обоснуем выбор пластинок, покрытых силикагелем. Учитывая стоимость и удобства, мы прежде всего выбрали бы пластинки с готовым слоем.

а. Для обычного качественного анализа используются стеклянные пластинки, покрытые силикагелем Merck Silica Gel H или HF254 (соответственно без флуоресцентных индикаторов и с индикатором). Время проявления на этих слоях невелико, и для обнаружения можно использовать большинство реагентов, включая самые агрессивные. К недостаткам можно отнести малую прочность слоя и связанные с этим неудобства хранения хроматограмм.

б. Для количественного анализа используют стеклянные пластинки с готовым слоем силикагеля Merck Silica Gel F или F254 соответственно без индикаторов флуоресценции и с ними. Слои адсорбента на этих пластинках достаточно прочны. Поэтому они очень полезны для полевых работ, и хроматограммы могут храниться в темноте бесконечно долго. Поскольку частицы адсорбента имеют очень маленькие размеры, скорости потока низки, однако полученные пятна очень четко очерчены, что важно при проведении прямого количественного анализа. При работе на этих пластинках для обнаружения можно использовать большинство агрессивных реагентов, хотя при температуре выше 130°C реагенты могут вступать в реакции с органическим связующим. Органическое связующее мешает также проведению спектроскопических измерений на пятнах после их элюирования с адсорбента.

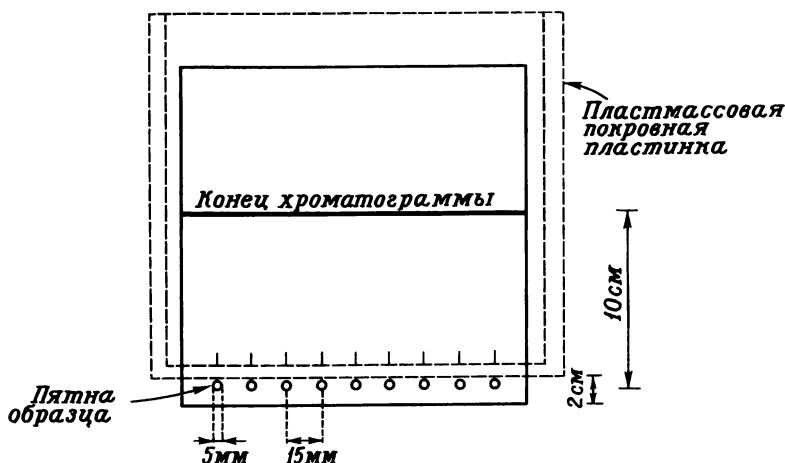
в. Чтобы идентифицировать разделенные вещества, элюированные с пластинки, применяя методы спектроскопии, используют приготовленные вручную стеклянные пластинки с нанесенным слоем силикагеля Merck Silica Gel HF254 или HR, так как эти адсорбенты, как было показано, почти не содержат органических загрязнений.

6.5. НАНЕСЕНИЕ ОБРАЗЦА

Образцы наносят на пластинки в виде 0,1–1%-ных растворов в неполярном летучем растворителе. Растворитель должен быть неполярным для того, чтобы уменьшить размывание пятна в точке нанесения образца. Он также должен быть низкокипящим, т.е. его температура кипения должна быть ниже 120°C , поскольку до начала проявления растворитель необходимо быстро испарить. Растворитель должен быть достаточно хорошим, чтобы растворенное вещество не выкристаллизовывалось из раствора прежде, чем оно будет нанесено на адсорбент.

6.5.1. Аналитический метод

Методика нанесения образца показана на рис. 6.3. Из ящика для хранения пластинок берут активированную пластинку и помещают



Р и с. 6.3. Нанесение пятен на пластинку.

на 15 ч в камеру, содержащую насыщенный водный раствор бромид натрия, чтобы активность пластинки стала постоянной, после этого ее помещают на плоскую скамейку и частично закрывают пластмассовым шаблоном, чтобы снизить возможность дальнейшей дезактивации влагой атмосферы. Шаблон помещают так, чтобы оставить на нижнем краю пластинки 2 см для нанесения образцов. Затем 2–10 мкл

раствора с образцом наносят с помощью микрошприца гамильтоновского типа объемом 10 мкл в виде серии пятен, отстоящих на 1,5 см от нижнего края пластинки. Следует избегать разрушения поверхности адсорбента при нанесении раствора. Такая проблема не возникает при использовании пластинок с готовым слоем силикагеля типа F. Диаметры пятен должны быть от 2 до 4 мм, а центры пятен должны отстоять на 10–15 мм. Шаблон помогает при нанесении пятен. После завершения нанесения пятен устанавливают предел, до которого должна доходить подвижная фаза: полностью соскабливают адсорбент, чтобы растворитель не мог мигрировать за эту линию. Расстояние между точкой нанесения образца и фронтом растворителя обычно составляет 10 см. Это расстояние соответствует оптимальным условиям для хорошего разрешения и небольшого времени анализа.

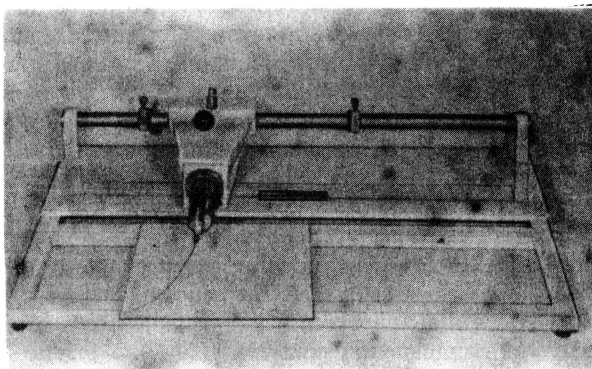
Для количественного анализа образец и раствор сравнения наносят иначе. Размеры пятен образца и "свидетеля" должны быть одинаковыми, а составы образца и раствора сравнения — как можно более одинаковыми. В частности, состав растворителя должен быть тем же самым. Было показано /10/, что главным источником ошибки в количественном анализе в хроматографии в тонком слое является воспроизводимость нанесения постоянного объема раствора на слой. Обычно при нанесении 1 мкл раствора стандартное отклонение достигает 10%. Такие большие ошибки вызываются растеканием растворителя по внешней поверхности иглы, что особенно заметно в случае полярных растворителей, таких, как метанол, и капиллярными явлениями, которые наблюдаются при касании тонким концом иглы поверхности адсорбента. В результате всасывания находящейся на стенке иглы капли в слой вводится дополнительное количество раствора. Пытаясь уменьшить эти ошибки, Бриджет и Релф разработали прибор "Chromaplot" (Burkhard Manufacturing Co. Ltd., Rickmansworth, Hertfordshire, England), в котором небольшие воспроизводимые объемы раствора "эжектируются" из иглы на пластинку. При использовании этого устройства стандартные отклонения были уменьшены до $< 3\%$ /10/.

Авторами главы установлено, что в денситометрии при нанесении 5 мкл раствора из гамильтоновского микрошприца объемом 10 мл, игла которого была спилена под прямым углом до длины 2 см, получались аналогичные стандартные отклонения в 3%. Обычно на пластинку наносили 5 мкл растворов соответствующих компонентов концентрации 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0% (т.е. 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мкг растворенного вещества) и очень аккуратно разбавляли растворы образцов таким образом, чтобы неизвестная концентрация, которую нужно измерить, равнялась 0,1–0,2%.

6.5.2. Препаративный метод

Разделение образцов размером более 50 мкг требует в первую очередь нанесения образца в виде узкой полосы и обязательного использования более толстых слоев адсорбента. Образцы вплоть до 50 мкг можно разделять на пластинках размером 20 x 20 см, покрытых слоем в 750 мкм. Дальнейшее увеличение толщины слоя приводит к серьезной потере разрешающей способности, тогда как дальнейшее увеличение размера образца обуславливает появление "хвостов", поскольку превышает линейную емкость адсорбента. Разделение образцов больших, чем 50 мкг, следует выполнять на нескольких пластинках, проявляемых параллельно, или методом хроматографии в колонке.

Введение больших образцов путем последовательного нанесения пятен и утомительно, и дает неудовлетворительные результаты, так как, даже имея хороший глазомер и твердую руку, можно получить нерегулярную полосу. В таких случаях целесообразно пользоваться стандартными приборами для нанесения полос. Имеется целый ряд таких устройств, однако следует сказать, что более дорогие автоматические приборы часто не имеют никаких преимуществ перед простыми, управляемыми вручную приборами, стоимость которых в 10 раз ниже.



Р и с. 6.4. Прибор для нанесения полос.

Примером такого неавтоматического устройства служит прибор, показанный на рис. 6.4.

С помощью шприца с микрометрическим винтом, установленного на направляющей с регулируемой длиной, наносят $2\text{--}20 \text{ мкл}\cdot\text{см}^{-1}$

(в зависимости от емкости шприца) через длинную изогнутую капиллярную трубку, лежащую свободно на слое адсорбента. Трубка легко поднимается с поверхности адсорбента при обратном ходе прибора. Образец обычно наносят в виде 5–10%-ного раствора в неполярном растворителе. Это означает, что 50 мг образца можно нанести на пластинку 20 x 20 см всего за 2 мазка. Между нанесением двух последующих мазков растворителю следует дать испариться.

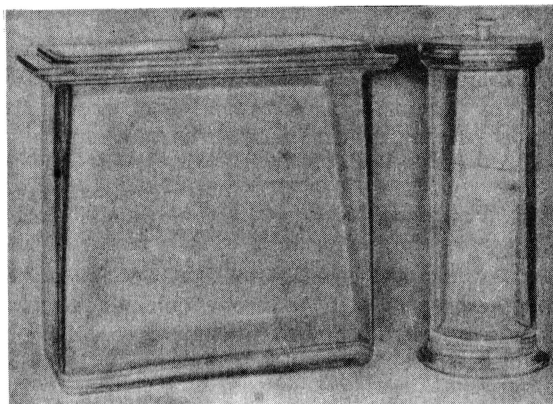
6.6. ВЫБОР ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

Факторы, которые следует учитывать при выборе подвижной фазы, были рассмотрены в гл. 3; в табл. 3.4 приведены растворители в порядке их возрастающей элюирующей способности.

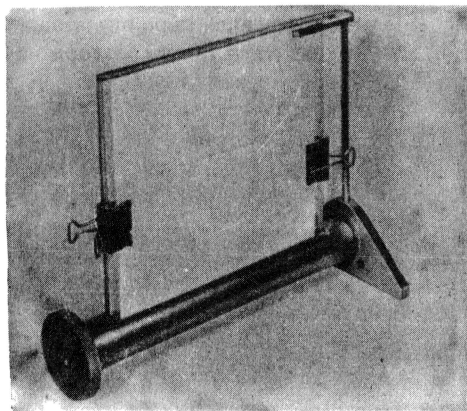
Предпочтительный метод выбора растворителя как для хроматографии в тонком слое, так и для колоночной хроматографии основывается на работе Пайфера /11/. Сложенную вместе пару покровных стекол для микроскопа погружают в суспензию адсорбента, состоящую, например, из 35 г силикагеля Н в растворе хлороформ – метанол (65–35 об.%), которая хранится в высоком стеклянном сосуде. Слайды вынимают, разделяют и дают им высохнуть. После этого на них наносят 2 мл 1%-ного раствора образца, подлежащего испытанию, и проявляют в сосуде для реактивов, содержащем немного растворителя с небольшой элюирующей силой. Это обычно занимает 2–3 мин. Обработанные таким образом пластинки вынимают, быстро сушат и устанавливают положение пятен с помощью подходящего обнаруживающего реагента. Эту операцию повторяют, используя растворители с большей элюирующей силой и, если необходимо, применяя для проявления бинарные или тройные смеси, до тех пор, пока значения R_f интересующих нас компонентов не будут находиться между 0,3–0,8. При этом имеется также возможность попробовать различные обнаруживающие реагенты.

6.7. ПРОЯВЛЕНИЕ ХРОМАТОГРАММ

Проявление хроматограмм обычно выполняют методом восходящей хроматографии, при котором подвижная фаза поднимается через слой с помощью капиллярных сил. Используются два типа камер для проявления, бак (или банка для небольших пластинок) (см. рис. 6.5) и С-камера, в которой покровная пластинка вместе с пластинкой, на которую нанесен слой, образуют фактически прямоугольный бак (рис. 6.6).



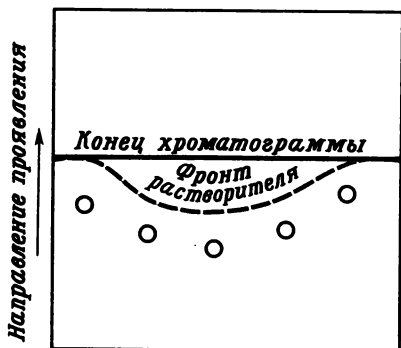
Р и с. 6.5. Камера для проявления хроматограмм.



Р и с. 6.6. С-камера (sandwich chamber).

6.7.1. Проявление в баке

Подвижную фазу наливают в бак на глубину 5 мм. Лист фильтровальной бумаги размером 15 x 40 см, свободный от смол и жиров, кладут в бак, согнув бумагу в виде буквы U, таким образом, чтобы бумага касалась широких стенок и дна бака, и тщательно смачивают растворителем путем встряхивания. Это способствует насыщению атмосферы бака парами растворителя. Бак оставляют стоять 30 мин при постоянной температуре вдали от прямых солнечных лучей для того, чтобы атмосфера в нем стала равновесной. Если равновесие паров не установится, то в процессе проявления может происходить испарение подвижной фазы с внешней стороны пластинки, вследствие чего, прежде чем будет достигнут предусмотренный предел фронта растворителя, через адсорбент пройдет большее количество подвижной фазы. Поэтому значения R_F при проявлении в ненасыщенной атмосфере выше и хуже воспроизводятся, чем значения R_F , полученные в насыщенной атмосфере. Далее, так как испарение растворителя по краям пластины происходит быстрее, чем в центре, образуется вогнутый фронт растворителя. Следовательно, значение R_F данного растворенного вещества по краям пластины больше, чем в центре (рис. 6.7).



Р и с. 6.7. Иллюстрация "краевого эффекта", обусловленного проявлением в ненасыщенной атмосфере.

Следует отметить, что в случае многокомпонентных подвижных фаз состав пара будет отличаться от состава жидкости. Поэтому до тех пор, пока не установится равновесие, состав подвижной фазы может непрерывно изменяться, особенно в тех случаях, когда один компонент значительно более летуч, чем другие. Если этот компонент полярный, он будет реадсорбироваться на несмоченных частях пластинки и модифицировать свойства адсорбента. Этот эффект был использован [12] в хроматографии в тонком слое "с программированием паров". Обычно бак для проявления пластинок размером 20 x 20 см делается из стекла с внутренними размерами 21 x 21 x 9 см с плоским внутренним основанием и хорошо подогнанной стеклянной крышкой.

Для проявления пластинок 5 x 20 см можно использовать цилиндрический стеклянный сосуд диаметром 8 см и высотой 22 см. Одновременно можно проявлять 2 пластинки, располагая их по стенкам и следуя, чтобы пластинки не соприкасались. При погружении пластинок

в подвижную фазу необходимо следить, чтобы пятно в точке старта находилось выше уровня растворителя в баке, иначе образец будет размываться.

6.7.2. С-камеры

В С-камерах влияние паровой фазы на воспроизводимость хроматограмм намного меньше, чем в камерах другого типа. Такого типа камеры предпочтительно использовать для точных работ, т.е. количественного анализа и измерения R_F .

В аппаратах фирмы "Desaga", разработанных Шталем, по краям пластинки размером 20 x 20 см удаляется полоска адсорбента шириной 0,5 см. Такая пластинка образует одну стенку камеры. Покровная пластинка помещается на пластинку со слоем неподвижной фазы и образует противоположную стенку. Боковыми стенками и крышкой являются 3 узкие стеклянные полоски толщиной 2–3 мм, припаянные к покровной пластинке. Образованная таким образом С-камера, или сэндвич-камера, удерживается с помощью сильных зажимов, а основание ее погружают в лоток, содержащий 25 мл подвижной фазы. Проявление должно проводиться при постоянной температуре, иначе подвижная фаза может испаряться с лицевой стороны пластинки с образцом и конденсироваться на покровной пластинке. Конденсация возможна в тех случаях, когда подвижная фаза имеет большую теплоту адсорбции. Все это ухудшает воспроизводимость. В настоящее время С-камеры выпускаются несколькими фирмами, причем некоторые модели предназначены специально для использования пластинок с готовым слоем.

6.7.3. Другие методы проявления

1. Нисходящее проявление. Подвижная фаза подается с помощью фитиля, погруженного в резервуар с растворителем, к верхнему краю вертикально расположенной пластинки. Эта методика с точки зрения длительности проявления и разрешения не имеет никаких преимуществ перед восходящим проявлением и из-за большей громоздкости аппаратуры используется редко.

2. Круговое проявление. Подвижную фазу медленно вводят в центр круглого пятна образца в середине горизонтально расположенной пластинки. Компоненты образца перемещаются к краям пластинки в виде концентрических колец. Этот метод используют, применяя покровные стекла для микроскопа, для быстрого подбора подвижной фазы /8/, но в других отношениях такие хроматограммы оценить трудно.

Скорость миграции растворителя можно ускорить, вращая пластинку в горизонтальной плоскости /13/.

3. *Горизонтальное проявление.* Бреннер и Нидервизер /14/ предложили показанный на рис. 6.8 прибор, известный как "горизонтальная BN-камера" (Horizontal BN-Chamber). Растворитель из склянки Дрекселя попадает через тефлоновую трубку в лоток и затем через бумажный фитиль на пластинку для ТСХ, расположенную на металлическом блоке, через который может циркулировать холодная вода. Пластика покрывается 18-сантиметровой покровной пластинкой, чтобы предотвратить испарение подвижной фазы из слоя.

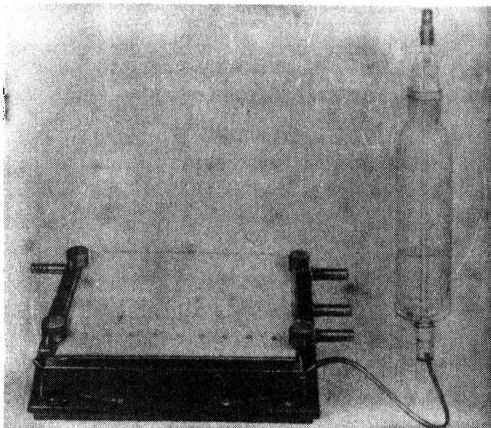
4. *Непрерывное проявление.* При применении этого метода фактически пластинки удлиняются, что позволяет улучшить разрешение медленно перемещающихся разделяемых веществ. Непрерывное проявление удобно проводить, используя описанную выше BN-камеру. Верхняя часть пластинки для ТСХ выступает на 2 см за край покровной пластинки и находится на металлическом блоке, который может быть нагрет горячей водой, паром или электрическим нагревателем. При появлении растворителя из-под покровного стекла он испаряется. Поскольку при таком методе проявления распознаваемый фронт растворителя не образуется, одновременно с образцом следует хроматографировать вещество сравнения X и определять соответствующие величины R_X (см. раздел с описанием методики).

5. *Множественное проявление.* По этой методике пластинка проявляется несколько раз в одном и том же растворителе, причем между проявлениями она высушивается. Это улучшает разделение медленнодвигающихся плохо разделяемых веществ. Окончательное значение R_F , обозначаемое nR_F , можно получить из значения R_F после одного проявления (1R_F), используя выражение

$${}^nR_F = 1 - (1 - {}^1R_F)^n,$$

где n — число проявлений.

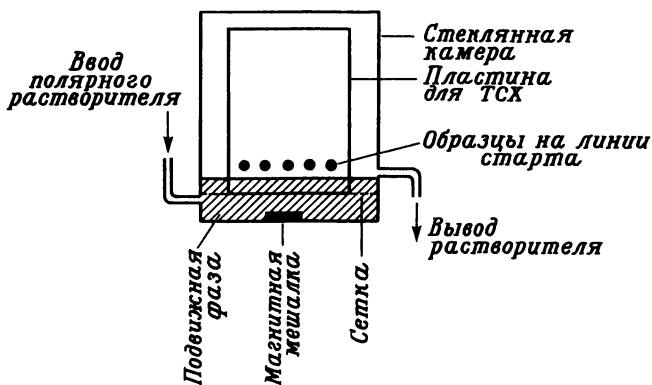
Этот метод был исследован Халпапом /15/.



Р и с. 6.8. Горизонтальная BN-камера.

6. Ступенчатое проявление. Это методика используется для разделения смесей, содержащих вещества самой различной полярности. Например, чтобы разделить полярные присадки в смазочных маслах /16/, пластинку сначала проявляют неполярной подвижной фазой, например толуолом, на всю длину пластинки. При этом основная углеводородная часть масла перемещается в верхнюю часть пластинки, а полярные присадки остаются у точки старта. Затем пластинку удаляют из камеры для проявления, подвижную фазу испаряют и пластинку повторно проявляют на стандартную длину 10 см полярной подвижной фазой, чтобы разделить смеси полярных присадок.

7. Градиентное элюирование. В этом методе в процессе проявления непрерывно изменяется состав подвижной фазы. Виланд и Детерман /17/ предложили камеру (рис. 6.9), в которой добавляемая для



Р и с. 6.9. Прибор для градиентного элюирования в тонком слое [17].

создания градиента полярная подвижная фаза через капиллярную трубку подается в левую часть проточной камеры и там смешивается при помощи магнитной мешалки с неполярной подвижной фазой, уже находящейся в камере. Пластина для ТСХ помещается на решетке, как показано на рис. 6.9. Объем подвижной фазы поддерживается постоянным за счет свободного истечения жидкости.

8. Двухмерное проявление. Эта методика используется для исследования сложных смесей. Образец наносится на один угол пластинки размером 20 x 20 см и проявляется на всю длину пластинки обычным способом, с тем чтобы получить максимально возможное разделение. Пластинку поворачивают на 90° и опять проявляют в другом направлении. Чтобы реализовать все преимущества этого метода, при

втором проявлении условия хроматографирования следует изменить. Это можно осуществить одним из двух способов:

а. Изменить природу неподвижной фазы: полностью удалив неиспользованную часть адсорбента, покрыть пластинку повторно другим адсорбентом; пропитать неиспользованный адсорбент высококипящей жидкостью с тем, чтобы разделение осуществлялось методом распределительной хроматографии или использовать электрофорез в тонком слое.

б. Изменить химическим путем природу частично разделенных веществ перед проявлением во втором направлении с использованием прежних неподвижной и подвижной фаз. Неизмененные вещества будут после проявления располагаться на диагонали, проведенной через пластинку, а вещества, подвергшиеся превращению, при проявлении во втором направлении будут иметь другие значения R_F . Химические превращения можно вызвать облучением, нагреванием, обработкой реакционноспособными газами (например, бромом) или обработкой активными химическими реагентами.

9. *Многозональное проявление.* В тех случаях, когда подвижная фаза состоит из двух и более растворителей с различной полярностью и растворитель расслаивается (см. гл. 3), наблюдается многозональное проявление. Расслоение растворителей обусловлено тем, что адсорбент имеет большее сродство к полярным растворителям, в результате образуется второй фронт растворителя. Подвижная фаза, находящаяся выше второго фронта растворителя, богаче менее полярными компонентами.

Нидервизер и Бреннер /18/ использовали это обстоятельство при подборе оптимальной системы растворителей для данного разделения. Образец наносят в виде пятен по диагонали на пластинку размером 20 x 20 см. Если пластинку проявляют многокомпонентной подвижной фазой, в которой происходит расслоение растворителей, то каждое пятно образца по очереди обрабатывается серией фронтов растворителей различного состава. Исследуя поведение образца в каждой зоне подвижной фазы, можно сделать правильный выбор подвижной фазы и осуществить оптимальное разделение смеси.

В недавно опубликованной работе /19/ по влиянию паров растворителя на разделение методом ТСХ показано, что если проявление пластинки выполняется в камерах с атмосферой, не насыщенной парами, то разделение в случае использования многокомпонентных растворителей более эффективно, чем в камерах, насыщенных парами. Улучшение разделения обусловлено главным образом наличием градиента концентрации, зависящего от скорости испарения компонентов растворителя и от их сродства к используемому адсорбенту.

Предложена камера с программированием паровой фазы /12/, в которой пластинка, обращенная слоем адсорбента вниз, помещалась

над серией лотков, содержащих растворители, состав паров которых можно контролировать и, таким образом, получать необходимый градиент полярности вдоль слоя на пластинке. Хроматограмма проявляется горизонтально, и, если необходимо достичь воспроизводимости результатов, следует тщательно контролировать температуру.

Теория и методика градиентного проявления в ТСХ (градиенты адсорбента, растворителя и системы растворитель – пар) недавно были рассмотрены в обзорных работах /20–22/.

Теория и практические приемы использования градиентного проявления в ТСХ сложны, что уменьшает основное достоинство метода – его простоту. Разделения, для которых необходима получаемая при этом степень разрешения, можно проще и быстрее выполнить методом градиентного элюирования в высокоэффективной хроматографии в колонках, позволяющей более легко контролировать условия разделения.

6.8. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ R_F

6.8.1. Введение

Таблицы значений R_F публикуются регулярно (например, в "Journal of Chromatography"). Эти данные, наряду со сведениями о поведении веществ по отношению к специфическим обнаруживающим реагентам, используют для предварительной идентификации разделенных веществ. В настоящее время воспроизводимость значений R_F в ТСХ намного хуже, чем в хроматографии на бумаге, но при стандартизации методики /23/ можно легко достичь воспроизводимости в пределах 0,05 R_F . Факторы, влияющие на R_F (помимо структуры растворенного вещества), изучались многими исследователями и обсуждались в 1967 г. на симпозиуме (см. список дополнительной литературы). Ниже приводятся известные факторы, которые могут влиять на воспроизводимость значений R_F , а также говорится о том, как уменьшить влияние этих факторов.

6.8.2. Факторы, влияющие на воспроизводимость

1. *Качество адсорбента.* Вероятно, наибольшей заслугой Штала в развитии ТСХ было его настойчивое требование стандартизации адсорбентов, и теперь многие адсорбенты для ТСХ имеют этикетку "по Шталю". Тем не менее продукты различных фирм все-таки могут отличаться из-за различия в свойствах поверхности, удельной поверхности и размера частиц. Это иллюстрируется табл. 6.1. Положение еще больше осложняется из-за появления большого числа типов пластинок с готовым слоем. Хорошая воспроизводимость может быть получена только в случае полной стандартизации адсорбентов для ТСХ и предпочтительно при исключении всех связующих.

Таблица 6.1

Пластины с готовым слоем и лабораторные образцы со слоем силикагеля Н

Фирма	Торговое название	Подложка	Толщина пленки, мкм	Связующее	Длительность проявления, мин	R_F^6		
						желтый	красный	голубой
E. Merck A.G. Darmstadt, Germany	Силикагель Н (Silica Gel H)	Н Стекло в	250	Нет	15	0,48	0,17	0,03
	Силикагель F (Silica Gel F)	F Стекло	250	Органическое	37	0,54	0,18	0,08
	Тип 5553 (Type 5553)	Алюминий	250	"	38	0,54	0,18	0,08
Distillation Products Industries, Eastman Kodak, Co., Rochester, N.Y.	Хромаграм (Chromagram)	Пластмасса	100	Поливиниловый спирт	45	0,76	0,34	0,23
	Махери-Нагель & Со., Duren, Germany	Пластмасса	100 или 200	Крахмал	26	0,56	0,19	0,08
Mallinckrodt, Chemical Works, St. Louis, Mo.	Хромар (Chromar)	Стекло- лодно	500 или 1000	Нет				
	Gelman Instrument Co., Ann Arbor, Mich.	Стекло- лодно		Нет	17	0,88	0,52	0,40
Camag A.G., Muttensz, Switzerland	DSF-A	Стекло	250	Неизвестно	21	0,47	0,15	0,08

а Время, за которое толщол поднимается на высоту 10 см.

б Контрольная смесь красителей для проявления толщолем в С-камере.
в Лабораторный образец.

2. Активность адсорбента. Выбрав стандартный адсорбент, необходимо контролировать его активность. Значения R_F растворенного вещества, проявляемого данным растворителем, могут меняться от 0,00 на полностью активированной пластинке до 1,00 на пластинке, выдержанной до установления равновесия в камере с относительной влажностью 90%. После нанесения слоя пластинка высушивается на воздухе и имеет неизвестную активность, зависящую от относительной влажности атмосферы. Даллас /24/ нашел, что пластинки, активированные нагреванием в печи при 110°C примерно в течение 3 мин в атмосфере с относительной влажностью 50%, поглощали около половины общего количества влаги, адсорбированной при равновесии. Значение R_F может измениться, если при нанесении на пластинку пятен на нее попадет воздух, выдыхаемый экспериментатором. Поэтому Даллас рекомендует для установления равновесия выдерживать пластинку с нанесенным слоем в течение 15 ч в закрытой камере, содержащей насыщенный водный раствор бромида натрия, что соответствует относительной влажности 58% при 20°C . Если накрыть пластинку шаблоном, можно безопасно нанести пятна, не изменяя заметно активность адсорбента. Сразу же после нанесения образцов пластинку для ТСХ следует поместить в С-камеру и проявить хроматограмму.

3. Толщина слоя. С помощью устройства для нанесения слоя получают влажный слой постоянной толщины (обычно равной 250 мкм), но толщина высушенного слоя зависит от скорости нанесения слоя, консистенции суспензии, содержания воды, размера частиц и равномерности нанесения слоя. Хотя некоторые исследователи утверждают, что они замечали небольшое возрастание значений R_F при увеличении толщины слоя, в настоящее время очевидно, что на слоях постоянной активности при проявлении в С-камерах значения R_F не зависят от толщины слоя в интервале 0,1 – 3 мм.

4. Чистота подвижной фазы. Для измерения точных значений R_F следует использовать растворители самой высокой чистоты. Присутствие небольших количеств загрязнений другой полярности может оказать существенное влияние на результаты. Даже в тех случаях, когда начинают использовать другую партию растворителя, полученную от одной и той же фирмы, следует проверять его чистоту. При применении в качестве подвижной фазы смешанных растворителей для каждого хроматографического опыта следует использовать свежую смесь, учитывая изменения в составе, вызываемые различиями в испарении или адсорбции в процессе каждого проявления или различиями в химическом взаимодействии между компонентами раствора.

5. Действие паров растворителя. Этот вопрос уже подробно рассматривался при обсуждении типов камер, используемых для проявления. Чтобы обеспечить быстрое насыщение паров растворителя вбли-

зи фронта растворителя и уменьшить модифицирование адсорбента парами растворителя, что необходимо для точного измерения R_F , всегда следует использовать С-камеры. Поскольку при проявлении в таких камерах сильно увеличивается возможность расслоения растворителя, выгодно использовать подвижные фазы, состоящие из одного чистого растворителя. В С-камере даже хлороформ, содержащий обычно для стабилизации 1% этанола, будет образовывать два различных фронта растворителей.

6. *Влияние температуры.* Увеличение температуры окружающего воздуха на 10°C может обусловить небольшое возрастание значения R_F , что связано с усилением испарения растворителя с лицевой стороны пластинки. Аналогичные явления наблюдаются в тех случаях, когда подвижная фаза имеет высокую теплоту адсорбции. Если подвижная фаза состоит из смеси растворителей, то различная их испаряемость может привести к изменению состава. При использовании С-камер изменения в значениях R_F незначительны, если температура поддерживается в пределах $\pm 2^\circ\text{C}$.

7. *Глубина слоя подвижной фазы.* На значение R_F пятна может влиять расстояние между точками нанесения образца и уровнем подвижной фазы в камере для проявления. Это особенно важно в тех случаях, когда подвижная фаза состоит из смеси растворителей различной полярности и ее элюирующая способность (т.е. состав в адсорбенте) зависит от расстояния, пройденного жидкой фазой. Поэтому в качестве стандарта принимают глубину подвижной фазы 0,5 см, а образцы наносят на 1,5 см выше нижнего края пластинки.

8. *Природа фронта растворителя.* При продвижении подвижной фазы через слой отношение количества подвижной фазы к стационарной не является постоянным, оно меньше вблизи фронта растворителя, чем на некотором расстоянии позади него. Даллас /24/ нашел, что если пластинку выдержать в течение 15 мин после того, как подвижная фаза пройдет установленное для нее расстояние, значения R_F несколько больше, чем измеренные сразу после окончания проявления, но более постоянны и лучше воспроизводятся. Это связано с тем, что отношение жидкой фазы к неподвижной становится одинаковым по всей длине хроматограммы.

Значения R_F , измеренные таким образом, не зависят от расстояния между точкой нанесения образца и фронтом растворителя, если подвижной фазой является чистый растворитель. Однако при применении смешанного растворителя часто наблюдается градиент концентрации растворителя вдоль пластинки, и значения R_F в таких случаях зависят от расстояния, пройденного подвижной фазой. Поэтому следует ввести стандартное расстояние, проходимое подвижной фазой при проявлении. Обычно его принимают равным 10 см.

9. *Скорость подвижной фазы.* В связи с тем что скорость установления равновесия не является бесконечной, значение R_F для данного вещества в рассматриваемой системе фаз зависит от скорости подвижной фазы, т.е. от используемого метода проявления (восходящий, нисходящий и горизонтальный). В случае восходящего проявления на величину R_F должен также влиять наклон пластинки. Если восходящее проявление проводится в С-камере в вертикальном положении, эта проблема не возникает. На скорость подвижной фазы влияет также размер частиц и пор адсорбента.

10. *Размер образца.* Значения R_F не зависят от размера образца, если только линейная емкость адсорбента не превышена, так как вне этого значения величина R_F возрастает или уменьшается в соответствии с размером образца в зависимости от того, какую форму имеет изотерма: выпуклую или вогнутую.

11. *Сложность образца.* Значения R_F разделяемых веществ могут зависеть от наличия других растворенных веществ. Поэтому для сравнения всегда следует приводить значения R_F чистых соединений, хроматографированных в отдельности.

12. *Точность измерения.* В случае асимметричных пятен возникают трудности с определением действительного положения центра массы. К счастью, пятна почти всех соединений, кроме очень полярных и хемосорбирующихся веществ, обычно имеют симметричную форму. Расстояние, пройденное пятном и подвижной фазой, обычно измеряют линейкой, калиброванной в миллиметрах. Ошибка каждого измерения составляет примерно $\pm 0,5$ мм. Поэтому для хроматограмм, на которых пятно переместилось на 5 см, а фронт растворителя — на 10 см, ошибка измерения будет составлять 1%, т.е. значение R_F будет равно $0,50 \pm 0,005$.

6.8.3. Выводы

Анализируя все перечисленные выше факторы, влияющие на величину R_F , можно понять, почему настолько плохой была в прошлом воспроизводимость значений R_F в хроматографии в тонком слое. Теперь, когда мы знаем все эти факторы, можно улучшить стандартизацию методики. Выше мы попытались показать, каким должен быть стандартный метод. Полезность публикуемых таблиц значений R_F , несмотря на плохую воспроизводимость последних, определяется тем, что эти таблицы: а) указывают, можно ли разделить данную группу соединений; такие сведения можно получить из таблиц значений R_F , опубликованных одной лабораторией, использующей свои стандартные условия, и б) такие таблицы служат, по крайней мере на первых порах, полезным руководством при выборе условий хроматографирования, когда экспериментаторы пытаются провести аналогичное разделение.

6.9. ДЕТЕКТИРОВАНИЕ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Бесцветные растворенные вещества на проявленной хроматограмме детектируются при рассмотрении хроматограммы в ультрафиолетовом свете или путем обнаружения окрашенных зон при опрыскивании пластинки окрашивающим реагентом. Третий, более специфичный метод заключается в определении местоположения радиоактивных растворенных веществ с помощью счетчика Гейгера или газопоточного счетчика.

6.9.1. Осмотр пластинки в ультрафиолетовом свете

Пластинки лучше всего рассматривать в затемненной комнате. Выпускается много различных видов подходящих источников УФ-излучения, в которых имеются две лампы: с эмиссионным максимумом при 365 и 254 нм, т.е. с длинно- и коротковолновым излучением. Хроматограммы, обнаруженные таким способом, можно фотографировать.

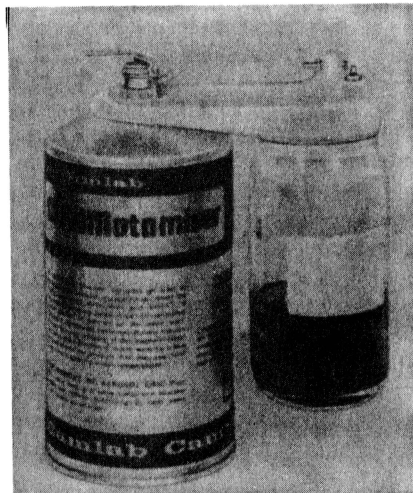
На чистом адсорбенте, например силикагеле Н, флуоресцирующие вещества поглощают в длинноволновой УФ-области, а сами излучают в видимой области, т.е. при более длинных волнах. Например, полиароматические углеводороды видны в виде ярко окрашенных пятен на темном фоне. Цвет пятен (желтый, оранжевый, зеленый, голубой, розовато-лиловый) часто помогает при идентификации материала. Этим методом можно детектировать менее чем 0,1 мкг большинства флуоресцирующих растворенных веществ.

Неорганические фосфоры (например, силикат или сульфид цинка) заключенные в адсорбент, позволяют видеть многие растворенные вещества, поглощающие в УФ-области, в виде блеклых розовато-лиловых пятен на ярко-зеленом флуоресцирующем фоне при рассмотрении пластинок, облучаемых коротковолновым ультрафиолетовым светом. Предел детектирования этим методом составляет примерно 5 мкг.

6.9.2. Обнаруживающие реагенты

Обычный способ обнаружения (выявления) положения бесцветных растворенных веществ на проявленной хроматограмме состоит в опрыскивании пластинок растворами реагентов, которые могут химически взаимодействовать с растворенными веществами. Некоторые реакции протекают на холоду, другие иногда требуют нагревания до такой степени, что происходит обугливание растворенных веществ после их опрыскивания агрессивными реактивами. В этом последнем случае реакции с органическими связующими или материалом подложки могут мешать обнаружению, что исключает возможность использования таких материалов. Наконец, для того, чтобы выявить действие окрашивающего реагента, некоторые пластинки необходимо рассматривать после опрыскивания в ультрафиолетовом свете.

Опрыскивание пластинки лучше всего выполнять с помощью стандартного распылителя, подобного показанному на рис. 6.10. Распылитель состоит из стеклянной банки емкостью 120 мл, содержащей раствор реагента, и баллона с распыляющим газом. Обе части связаны пластмассовым узлом, содержащим трубки, краны и небольшое сопло, обеспечивающее мелкое разбрызгивание при нажатии на кран



Р и с. 6.10. Опрыскиватель

В качестве распыляющего газа можно использовать фторуглероды. Все части устройства дешевы и взаимозаменяемы. Если опрыскиватель изготовлен целиком из пластмассы, можно использовать даже весьма коррозионноактивные реагенты. Мелкое разбрызгивание обеспечивает однородное нанесение реагента на пластинку. Операции разбрызгивания должны выполняться в вытяжном шкафу с хорошей тягой.

Можно выделить два типа окисляющих реагентов: а) реагенты общего назначения, взаимодействующие с целым рядом соединений различного типа, и б) специфические реагенты, указывающие на присутствие данного соединения или данной функциональной группы. Ниже мы опишем приме-

ры реагентов обоих типов, обычно используемых в промышленном органическом анализе.

Реагенты общего назначения

1. Пары иода. Пластинка помещается в закрытую банку, содержащую несколько кристаллов иода. Пары иода растворяются в большинстве органических соединений, которые становятся заметными в виде коричневых пятен на бледно-желтом фоне. Во многих случаях после обнаружения пятен иод можно испарить и пластинку еще раз опрыскать другим реагентом. Растворенное вещество можно также вымыть с адсорбента для дальнейшего анализа. Следует отметить, что в этом случае химическая природа растворенного вещества может быть изменена, так как многие соединения вступают с иодом в реакции замещения или присоединения. Пятна, обнаруженные с помощью иода, на воздухе быстро обесцвечиваются. Можно замедлить обесцвечивание и повысить чувствительность реакции, если провести

последующее опрыскивание пластинки 7,8-бензофлавоном (0,3 г реагента растворяют в растворе 95 мл этанола + 5 мл 30%-ной серной кислоты). Этот реагент дает интенсивное голубое окрашивание с иодом. Чтобы получить максимальный цветовой контраст, пластинку следует опрыскать сразу, как только исчезнет окрашивание фона после обработки иодом.

2. *Бихромат-серная кислота.* Для приготовления реагента 5 г бихромата натрия растворяют в 100 мл 40%-ной серной кислоты. После опрыскивания свободной от растворителя пластинки ее недолго нагревают до 110°C, при этом большинство органических веществ проявляется в виде светло-голубых пятен на оранжевом фоне. Нагревание при более высоких температурах (200°C) приводит к обугливанию пятен, т.е. к образованию черных зон на бесцветном фоне. Эта методика непригодна, если адсорбенты содержат органические связующие, а также если используются пластинки с готовым слоем, имеющие пластмассовую или металлическую подложку. Вместо смеси бихромат натрия – серная кислота можно применять смеси серной кислоты с такими реагентами, как уксусный ангидрид, азотная, хлорная или фосфорная кислота.

3. *Фосформолибденовая кислота.* Опрыскивание хроматограмм 5%-ным раствором кислоты в изопропанол с последующим недолгим нагреванием до 110°C дает темно-голубые пятна на желтом фоне; реагент вступает в реакцию с большим числом органических соединений. Последующая обработка пластинки парами аммиака обесцвечивает фон пластинки. Окраска очень стабильна, и хроматограммы можно сохранять в темноте в течение многих лет. Хорошо разделенные пятна, выявленные этим реагентом, вполне подходят для количественного анализа. Готовый для немедленного использования реагент можно приобрести в аэрозольной упаковке.

4. *Родамин В.* 50 мг красителя растворяют в 100 мл этанола. Реагент дает розовато-лиловые пятна на розовом фоне с большим числом органических веществ. Окраску пятен усиливают, обдувая пластинку парами брома до обесцвечивания фона. При рассмотрении пластинки в длинноволновом ультрафиолетовом свете видны оранжевые флуоресцентные пятна на темном фоне.

5. *Трихлористая или пятихлористая сурьма.* Реагент используется в виде 10–20%-ного раствора в хлороформе или четыреххлористом углероде. После кратковременного нагревания опрысканных пластинок при 110°C многие органические вещества дают пятна различного цвета на белом фоне. Различие в окраске пятен может быть использовано для характеристики определенных классов компонентов.

6. *Вода.* Пластинку опрыскивают водой до тех пор, пока слой не станет прозрачным, гидрофобные разделенные вещества при этом проступают в виде опаловых пятен на полупрозрачном фоне. Пятна обво-

дят остро отточенным карандашом, пластинку высушивают и еще раз опрыскивают другим реагентом или соскребают слой адсорбента микрошпателем и элюируют растворенное вещество для дальнейшего анализа.

Специфические реагенты

Шталь /57/ и Киршнер /58/ приводят соответственно 266 и 204 окрашивающих реагента. Многие из этих реагентов были разработаны для обнаружения природных и биохимических продуктов. В табл. 6.2 приведены некоторые реагенты, по нашему мнению, полезные для использования в промышленных лабораториях.

Таблица 6.2

Реактивы, применяемые для определения функциональных групп

Класс соединений	Реактив	Методика	Результат
Кислоты	Бромкрезоловый зеленый	0,04 г в 100 мл этанола, добавляют 0,1 н. NaOH, пока не появится голубое окрашивание	Желтые пятна на зеленом фоне
	2,6-Дихлорфенол - индофенол (натриевая соль)	0,1 г в 100 мл этанола	Красные пятна на голубом фоне
Спирты	Церийаммоний-нитрат	6 г в 100 мл 4н. HNO ₃	Коричневые пятна на желтом фоне
	Ванадий-8-оксихинолин	0,1 г в 100 мл хлороформа, свободного от спирта	Красные пятна на зеленом фоне
Альдегиды	o-Дианизидин	Насыщенный раствор в уксусной кислоте	Различные пятна
	2,4-Динитрофенилгидразин	0,4 г в 100 мл 2н. HCl Повторно опрыскивают 0,2%-ным раствором феррицианида натрия в 2 н. HCl	Пятна от желтого до красного цвета на бледно-оранжевом фоне Оливково-зеленые пятна на желтом фоне
Амиды	Гидроксиламин-нитрат железа	а) 1 г гидроксиламингидрохлорида в 9 мл воды;	Пятна различной окраски на бесцветном фоне

Класс соединений	Реактив	Методика	Результат
Амины	Тиоцианат кобальта	б) 2 г NaOH в 8 мл воды; в) 4 г $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ в 60 мл воды и 40 мл уксусной кислоты. Опрыскивают смесью (а) и (б) 1:1 по объему, сушат 10 мин при 110°C, опрыскивают 45 мл смеси (в) и 6 мл конц. HCl 3 г тиоцианата аммония и 1 г хлористого кобальта в 20 мл воды	Первичные, вторичные и третичные алифатические амины дают голубые пятна на розовато-белом фоне
	Нингидрин (трикетогидринден)	0,3 г в 100 мл <i>n</i> -бутанола, к раствору добавляют 3 мл уксусной кислоты	Желтые, розовые или розовато-лиловые пятна на белом фоне
	Салициловая кислота	1 г в 100 мл толуола	Первичные алифатические и ароматические амины дают желтые пятна на белом фоне
	<i>n</i> -Диметил-аминобензальдегид	1 г в 100 мл уксусной кислоты	Ароматические амины дают желтые или оранжевые пятна на бесцветном фоне
	2,3-Дихлор-1,4-нафтахинон	1 г в 100 мл толуола	Большинство аминов дает от оранжевых до пурпурных пятен на светло-оранжевом фоне
	Диазотированный <i>n</i> -нитроанилин	0,3 г <i>n</i> -нитробензол-фторбората диазония в 35 мл диоксана и 65 мл воды	Ароматические амины дают желтые, оранжевые или красные пятна на светло-желтом фоне
Ангидриды	Гидроксиламин-нитрат жезла	См. Амиды	-

Продолжение таблицы 6.2.

Класс соединений	Реактив	Методика	Результат
Анти-оксиданты	Дихлорхинон - 4-хлоримин (или соответствующее дибромсоединение)	1 г в 100 мл этанола; через 15 мин опрыскивают 2%-ным раствором буры в 4%-ном этаноле	Пятна различного цвета на белом фоне
Основа	Бромкрезоловый зеленый	См. Кислоты	Голубые пятна на зеленом фоне
Хлорсодержащие углеводороды	Нитрат серебра	0,1 г в смеси 1 мл воды, 10 мл 2-феноксиэтанола и 190 мл ацетона; к раствору добавляют 1 каплю 30%-ной H_2O_2 . После опрыскивания выдерживают 15 мин в длинноволновом ультрафиолетовом свете	Серые пятна на бесцветном фоне
Хлорсодержащие инсектициды	Метилловый желтый	0,1 г в смеси 75 мл этанола и 25 мл воды, после опрыскивания выдерживают 5 мин в ультрафиолетовом свете	Красные пятна на желтом фоне
	Дифениламин - хлорид цинка	По 0,5 г каждого соединения растворяют в 100 мл ацетона; после опрыскивания нагревают 5 мин при $200^{\circ}C$	Пятна различного цвета
	N,N-Диметил- <i>n</i> -фенилендиаммоний дихлорид	В 100 мл этанола растворяют 1 г Na и затем 0,5 г реактива; после опрыскивания выдерживают 1 мин в ультрафиолетовом свете	Красные пятна на бледном фоне
Эфиры 3,5-динитробензойной кислоты	α -Нафтил-амин	1 г в 100 мл этанола	Оранжевые пятна на белом фоне

Продолжение таблицы 6.2.

Класс соединений	Реактив	Методика	Результат
1,2-Диолы	Тетраацетат свинца	1 г в 100 мл толуола	Белые пятна на коричневом фоне
Этаноламины	Бензохинон	1 г в 20 мл пиридина и 80 мл <i>n</i> -бутанола	Красные пятна на бледном фоне
Сложные эфиры	Гидроксил-амин – нитрат железа	См. Амиды	
Гетероциклы	Диазотированный <i>n</i> -нитро-анилин	См. Амиды	
	Формальдегидсерная кислота	См. Полиядерные ароматические соединения	
	Тетрацианоэтилен	10 г в 100 мл толуола	Пятна различного цвета на белом фоне
Гидроксамовые кислоты	Хлорное железо	2 г в 100 мл 0,5 н. HCl	Красные пятна на окрашенном фоне
Кетоны	<i>o</i> -Дианизидин	См. Альдегиды	Пятна различного цвета
	2,4-динитрофенилгидразин	См. Альдегиды	Голубые пятна на белом фоне
Соединения с метиленовыми группами (активированные)	Нитропруссид натрия	1 г в 50 мл 2 н. NaOH и 50 мл этанола	Красно-фиолетовые пятна на бледном фоне
Эфиры азотной кислоты	Дифениламин	1 г в 100 мл этанола; после окисливания выдерживают в коротковолновом ультрафиолетовом свете	Желто-зеленые пятна на белом фоне

Продолжение таблицы 6.2.

Класс соединений	Реактив	Методика	Результат
Перекиси	Гидрохлорид N,N-диметил- <i>n</i> -фенилендиамида Тиоцианат железа (II)	1 г в смеси 75 мл метанола, 24 мл воды и 1 мл уксусной кислоты а) 4 г сульфата железа (II) в 100 мл воды; б) 1,3 г тиоцианата аммония в 100 мл ацетона; опрыскивают смесью 10 мл (а) и 15 мл (б)	Пурпурные пятна на розовом фоне Красно-коричневые пятна на бледном фоне
Фенолы	4-Аминоантипирин 2,6-Дихлорхинон-4-хлоримин Хлорное железо Дiazотированный <i>n</i> -нитроанилин Ванилин	а) 3 г в 100 мл этанола; б) 8 г феррицианида калия в 100 мл H ₂ O; последовательно опрыскивают (а) и (б) и затем выдерживают в парах аммиака См. Антиоксиданты См. Гидроксамовые кислоты См. Амины 1 г в 100 мл конц. H ₂ SO ₄	Красные, оранжевые или розовые пятна на бледном фоне Пятна различного цвета на белом фоне Голубые или зеленые пятна на белом фоне Желто-оранжево-коричневые пятна на бесцветном фоне Желтые пятна на белом фоне
Фентиазины	Хлорид палладия	0,5 г в 50 мл воды и 50 мл ацетона, к раствору добавляют 2 капли конц. HCl	Голубые пятна на бледно-желтом фоне
Эфиры фосфорной кислоты	Молибдат аммония - хлорная кислота	0,5 г молибдата аммония растворяют в 5 мл воды и 1 мл конц. HCl, добавляют 2,5 мл хлорной кислоты и	Голубые пятна на белом фоне

Класс соединений	Реактив	Методика	Результат
		охлаждают, разбавляют до 50 мл ацетоном и оставляют на 24 ч; после опрыскивания выдерживают 2 мин над инфракрасной, затем 7 мин над длинноволновой ультрафиолетовой лампами	
Фосфорные кислоты	Молибдат аммония – хлористое олово	а) 1 г молибдата аммония растворяют в 100 мл воды; б) 1 г хлористого олова растворяют в 100 мл 10%-ного HCl; опрыскивают (а), сушат и опрыскивают (б)	Голубые пятна на белом фоне
Фосфорсодержащие инсектициды	4-(<i>n</i> -Нитробензил)пиримидин	а) 2 г растворяют в 100 мл ацетона; б) 10 г карбоната аммония растворяют в 50 мл воды и 50 мл ацетона; обильно опрыскивают (а) и слегка (б)	Голубые пятна на белом фоне
Эфиры фталевой кислоты	Диазотированный <i>n</i> -нитроанилин	См. Амины	Желтые пятна на белом фоне
	Резорцин	а) 2 г хлористого цинка и 20 г резорцина растворяют в 100 мл этанола; б) 4 н. H ₂ SO ₄ ; в) 40% КОН. Опрыскивают (а) и нагревают 10 мин при 150°C, опрыскивают (б) и нагревают 20 мин при 120°C, в заключение опрыскивают (в)	Оранжево-красные пятна на желтом фоне

Продолжение таблицы 6.2.

Класс соединений	Реактив	Методика	Результат
Поли-ядерные ароматические углеводороды	Формальдегид - серная кислота	2 мл 37%-ного формальдегида растворяют в 100 мл конц. H_2SO_4	Пятна различного цвета на белом фоне
Сульфаты, сульфаты	Тетрацианоэтилен	См. Углеводороды	Пятна различного цвета на белом фоне
Сульфаты, сульфаты	Пинакриптоловый желтый	0,05 г в 100 мл воды, растворяют, смотрят в длинноволновом ультрафиолетовом свете	Оранжевые пятна на бледно-голубом фоне
Серусодержащие соединения	Хлорид палладия	См. Фентиазины	Коричневые пятна на бледно-желтом фоне
	Азид иода	3 г азид натрия в 100 мл 0,1 н. иода; сразу после использования выбрасывают (твердый азид иода взрывоопасен!)	Темно-коричневые пятна на бледно-коричневом фоне
Терпены	Дифенилпикрилгидразил	60 мг в 100 мл хлороформа	Желтые пятна на пурпурном фоне
Эфиры	Хлористый палладий	См. Фентиазины	Коричневые пятна на бледно-коричневом фоне
Тиофосфорной кислоты	Флуоресцеин - бром	0,1 г флуоресцеина растворяют в 100 мл этанола, после опрыскивания выдерживают над парами брома, смотрят в длинноволновом ультрафиолетовом свете	Желтые пятна на розовом фоне
Ненасыщенные соединения			

6.10. ЗАПИСЬ ХРОМАТОГРАММ

При описании деталей хроматографического разделения в тонком слое необходимо: указать тип образца, его размеры и концентрацию, дать описание неподвижной фазы, толщины слоя, подвижной фазы, ка-меры для проявления, указать необходимую степень насыщения последней парами и, наконец, следует указать использованный метод обнаружения, его чувствительность и значения R_F разделенных компонентов. Однако таблица значений R_F еще не дает представления о действительной хроматограмме, так как она не описывает размер и форму пятен и поэтому не позволяет судить о достигнутом разделении или количественном составе образца. Основываясь только на значениях R_F , нельзя установить, какова концентрация растворенного вещества (большая, средняя или крайне малая). Чтобы получить эти сведения, необходимо сохранить хроматограмму или ее копию. Получить эти сведения можно также с помощью денситометрических измерений.

Обладающие прочными слоями адсорбентов пластинки с готовым слоем фирмы "Merck" или менее объемистые листы фирмы "Chromogram" можно сохранять в лабораторных журналах или в темных ящиках. Детали хроматограмм можно осторожно описать на пленке адсорбента мягким карандашом или даже шариковой ручкой. В тех случаях, когда пятна видны только в ультрафиолетовом свете, их границы надо обвести карандашом прямо на слое. Используемые обнаруживающие реагенты должны давать стабильную окраску. Хорошим обнаруживающим реактивом общего назначения является фосфорномолибденовая кислота, и мы в течение нескольких лет сохраняли хроматограммы, выявленные этим реактивом.

Если предполагается, что со временем окраска будет исчезать, следует изготовить копию хроматограммы. В простейшем случае для этого применима и калька. Удобно сфотографировать хроматограмму аппаратом "Polaroid". Если хроматограмма представляет особенную ценность, то следует получить цветную фотокопию в виде слайда или цветного негатива, с которого можно изготовить любое количество цветных отпечатков. Фотографию можно сделать при дневном свете или при ультрафиолетовом освещении, используя подходящие фильтры. Самые лучшие результаты получаются в тех случаях, когда возбуждающий свет падает на пластинку под углом 45° . Хроматограммы с плохим контрастом лучше всего фотографировать в проходящем свете.

6.11. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ НЕПОСРЕДСТВЕННО НА СЛОЕ

6.11.1. Введение

Методы количественной оценки хроматограмм в тонком слое можно разделить на две категории. В первом случае разделенные вещества исследуют непосредственно на слое, а во втором – прежде чем

анализировать вещества дальше, их вымывают из слоя адсорбента.

Исследование вещества на слое может быть выполнено путем измерения только площади пятна или, лучше, интегрированной площади и плотности пятна на проявленной и обнаруженной хроматограмме или на ее фотокопии или фотографии. Эти величины затем связывают с количеством вещества в пятне, используя стандарты и калибровочные кривые. Для образцов и стандартов, хроматографированных одновременно, эти измерения можно сделать при визуальном сравнении, путем измерения площадей, с помощью денситометрии, флуориметрии, спектрофотометрии и методом меченых атомов.

При получении хроматограмм для прямого количественного анализа на пластинках следует придерживаться определенных условий. Это вызвано тем, что площадь пятна данного растворенного вещества на проявленной хроматограмме зависит от полярности растворителя, использованного для приготовления образца, подлежащего хроматографированию, расстояния, пройденного пятном на хроматограмме, и близости других пятен. Поэтому при проведении прямого количественного анализа на слое необходимо руководствоваться следующими рекомендациями.

а. На пластинку должны быть нанесены одинаковые объемы растворов веществ и стандартов. Площадь пятен на старте каждый раз должна быть одной и той же. Поэтому раствор наносят по каплям и дают растворителю испариться после добавления каждой капли.

б. При приготовлении образцов и стандартов следует пользоваться одним и тем же растворителем.

в. Чтобы уменьшить ошибки, связанные с изменениями в толщине слоя и методикой обнаружения пятен, следует хроматографировать образцы и стандарты на одной пластинке рядом.

г. Концентрации образцов и стандартов следует выбирать таким образом, чтобы они были как можно ближе и чтобы отклик был максимальным и линейным. Это зависит от природы разделяемого вещества и чувствительности реагента для обнаружения. Обычно самый маленький стандарт должен быть едва видим, а самый большой — должен иметь концентрацию примерно в пять раз больше. Наиболее точные результаты получают на тех образцах, которые соответствуют нижнему участку калибровочной кривой.

д. Расстояние, пройденное всеми стандартами и образцами на одной и той же пластинке, должно быть идентичным. Этого лучше всего достигают, используя С-камеры.

В соответствующих разделах уже были описаны методы, которые следует использовать при нанесении образца и получении хроматограмм. Мы нашли, что для прямого количественного анализа пригодны пластинки с готовым слоем силикагеля фирмы "Merck". Однород-

ные слои нанесенного адсорбента, достаточно прочны, чтобы с ними можно было работать без особых мер предосторожности. Частицы силикагеля имеют очень маленькие размеры, поэтому скорость подвижной фазы меньше, чем на пластинках, приготовленных вручную, и получить компактные однородные пятна на них легче. Из-за отсутствия органического связующего в адсорбенте не представляется возможным проводить обнаружение обугливанием серной кислотой, тем не менее для обнаружения можно применять большинство других реагентов, включая некоторые агрессивные реагенты, например фосфомолибденовую кислоту и треххлористую сурьму.

Для некоторых лабораторий главное значение имеет тот факт, что ТСХ может быть быстрым и простым методом, не требующим дорогого оборудования. В таких лабораториях довольствуются использованием методов визуального сравнения и точность в пределах 5–30% считается вполне приемлемой.

В тех лабораториях, где считают необходимым получить максимум информации из хроматограмм, пользуются одним или несколькими чувствительными устройствами, позволяющими получать количественные данные с точностью 2–10%.

Далее мы рассмотрим прямые количественные методы.

6.11.2. Визуальное сравнение

Метод визуального сравнения имеет следующие достоинства: это быстрый метод, не требующий специального оборудования, вполне пригодный в тех случаях, когда нужна только полуколичественная оценка ($\pm 20\%$). При проведении серийных анализов образцов близкого состава точность метода можно улучшить по меньшей мере до $\pm 10\%$, если строго придерживаться указанных выше условий. Точность определения наибольшая, если концентрации образцов и стандартов находятся в такой области, где изменению веса вещества отвечают наиболее сильные изменения площадей и интенсивностей пятен. Поскольку соседние разделяемые вещества влияют друг на друга, состав растворов сравнения должен быть как можно ближе к составу вещества. Для увеличения точности желательно, чтобы одну и ту же хроматограмму независимо оценивали несколько сотрудников. В связи с этим стоит заметить, что молодые женщины лучше оценивают хроматограммы, чем пожилые мужчины. Исследователь должен хорошо различать цвета. Это является очевидным требованием, но часто его не принимают во внимание.

6.11.3. Измерение площади

Хотя данный метод более утомителен и занимает больше времени, он объективнее по сравнению с визуальным и позволяет получать результаты с точностью 5–10%. Как уже отмечалось выше, площадь

окончательного пятна зависит от большого числа факторов, поэтому условия получения качественных хроматограмм должны очень тщательно соблюдаться. Этот метод не учитывает изменений интенсивности пятна.

Площади пятен можно измерить планиметром, взвешиванием копии пятна на кальке или на фотографии, а также копированием на миллиметровую бумагу с последующим подсчетом числа квадратов. Трудности возникают при определении границ пятна. В связи с малыми размерами пятен в ТСХ (15–150 мм²) погрешности в определении границ пятен являются главным источником ошибок. Количество материала в пятне находят по зависимости веса материала от площади пятна, найденной для стандартных образцов. Например, Гиддингс и Келлер /25/ показали теоретически, а Бреннер и Нидервизер /26/ экспериментально, что между площадями пятен и логарифмом веса нанесенного вещества существует линейная зависимость. Однако Пурди и Тратер /27/ нашли линейную зависимость между корнем квадратным из площади пятна и логарифмом веса нанесенного вещества, причем это соотношение выполняется в широком диапазоне концентраций.

Чтобы избежать построения калибровочных кривых, эти авторы предложили алгебраический метод, основанный на проведении анализа трех растворов на одной и той же пластинке, а именно стандартного раствора, раствора образца и разбавленного раствора образца. Вес вещества W в растворе образца определяется выражением

$$\log W = \log W_s + [(\sqrt{A} - \sqrt{A_s}) / (\sqrt{A_d} - \sqrt{A})] \log D,$$

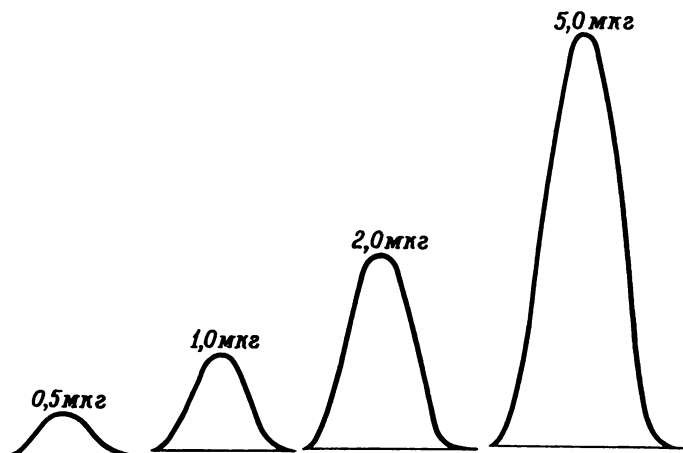
где W – вес вещества в растворе образца до разбавления, W_s – вес вещества в стандартном растворе, D – коэффициент разбавления, A_s – площадь пятна стандарта, A – площадь пятна раствора образца, A_d – площадь пятна вещества в разбавленном растворе образца.

Используя это выражение, Пурди и Тратер нашли, что среднее стандартное отклонение для 600 разделений по методу адсорбционной хроматографии составляло 3,1%, а для 980 разделений с использованием распределительной хроматографии – 3,6%. Об использовании метода измерения площади много раз сообщалось в литературе, причем стандартные отклонения составляли 5–10%.

6.11.4. Метод денситометрии

Пластинку для ТСХ размером 20х20 см, содержащую хроматограммы пяти стандартов и десяти образцов, можно оценить с помощью метода денситометрии менее чем за 10 мин. Однако в этом случае уже необходим более дорогой прибор.

Методом денситометрии измеряется суммарная функция площади пятна и его интенсивности. Это означает, что начальная площадь нанесенного пятна больше не является таким критическим параметром, как в двух предыдущих методах, хотя следует все-таки заботиться о том, чтобы площади пятен были одинаковыми. Факторы, влияющие на площадь окончательного пятна, влияют и на его интенсивность, но противоположным образом. Голдман и Гудол /28/ рассмотрели теоретические основы денситометрии, которая базируется на теории Кубелки – Мунка, описывающей взаимодействие света с беспорядочно распределенным поглощающим веществом, и пришли к выводу, что проводить измерения предпочтительнее в проходящем свете, чем в отраженном.

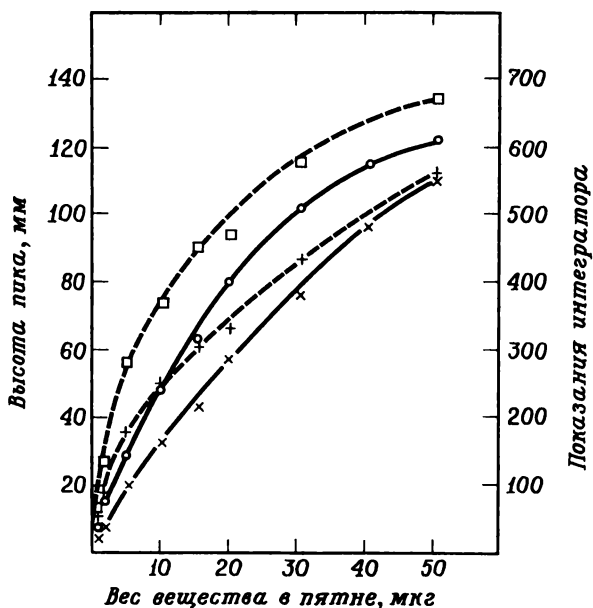


Р и с. 6.11. Запись денситометрии антиоксиданта.

Условия проведения опыта: адсорбент – силикагель F254; растворитель – толуол; обнаруживающий реактив – фосфорномолибденовая кислота; щель $10 \times 10 \times 0,5$ мм; светофильтр голубой.

Метод включает сканирование конечного пятна на хроматограмме пучком света; причем прошедший или отраженный свет попадает на фотоумножитель. Разность в интенсивностях падающего и прошедшего или отраженного света измеряется в виде электрического сигнала и записывается на графике, как показано на рис. 6.11. Высота пика является мерой интенсивности пятна, поскольку ширина пика пропорциональна длине пятна в направлении сканирования. Соотношение между площадью пика и весом вещества в пятне получают, измеряя площадь под кривой, например умножая высоту пика на его ширину на половине высоты или используя интегратор (см., например, рис. 6.12).

Все пятна должны находиться на одной и той же хроматограмме, и при их получении следует соблюдать все меры предосторожности, о которых говорилось выше. Вероятно, можно утверждать, что ошибки, связанные с получением воспроизводимых хроматографических пятен, намного превышают ошибки, присущие собственно денситометрии (см. табл. 6.3 и 6.4).



Р и с. 6.12. Калибровочные кривые для *n*-нонилфенола [56].

Диазотированный *n*-нитроанилин: □ высота пика, + показания интегратора; фосфомолибденовая кислота: ○ высота пика, × показания интегратора.

Хотя в продаже имеется несколько приборов (табл. 6.5), в настоящее время, по-видимому, чаще всего используются два прибора — "Photovolt" в США и "Chromoscan" в Европе. В работе /29/ дано описание денситометра "Chromoscan", в работах /30/ и /31/ дана критическая оценка его применимости для ТСХ. Прибор был довольно успешно использован рядом исследователей /32–36/; причем для выявления хроматограмм применялись различные обнаруживающие реагенты: например, применяли обугливание серной кислотой, использовали фосфомолибденовую кислоту, нингидрин (для аминокислот), диазотированный *n*-нитроанилин (для фенолов) и иод. В последнем

случае, чтобы уменьшить скорость испарения иода, хроматограмму накрывали тонкой стеклянной пластинкой.

С наибольшими ошибками связан процесс обнаружения пятен. Чтобы уменьшить ошибки, следует, во-первых, выбирать реагенты, образующие окрашенные пятна, резко контрастирующие с фоном, во-

Таблица 6.3.

Воспроизводимость измерений одного пятна ^a

	Измерение высоты пика	Измерение с помощью интегратора
Число определений	18	8
Среднее значение, мм	122,6	573
Максимальные и минимальные значения, мм	121,0 - 124,0	560 - 585
Стандартное отклонение	1,0	7,9
Ошибка, %	±0,8	±1,4

^a 15 мкг *n*-нонилфенола в смазочном масле, обнаружение с помощью диазотированного *n*-нитроанилина.

Таблица 6.4.

Точность определения *n*-нонилфенола в смазочном масле

	Измерение с помощью интегратора	Измерение высоты пика
Число определений	10	10
Среднее значение, мкг	15,0	15,4
Действительное значение, мкг	15,0	15,0
Максимальные и минимальные значения, мкг	14,6 - 15,4	14,6 - 15,8
Стандартное отклонение	0,26	0,41
Ошибка, %	±1,7	±2,8

вторых, добиваться, чтобы интенсивность окраски была воспроизводимой и пропорциональной количеству вещества, в-третьих, равномерно опрыскивать пластинку для получения однородного слабого фона. Контрастность пятна можно увеличить, установив на пути падающего светового луча фильтры дополнительных цветов.

Обычно пятна сканируют в направлении проявления хроматограммы, конечно, при условии, что пятна разделены достаточно хорошо, чтобы можно было установить линию уровня фона (соответствующую цветовому фону опрысканной пластинки).

При сканировании источником света в виде пятна достигают большей чувствительности, но из-за трудности установления такого источника света по центру пятна на хроматограмме большую точность получают при сканировании с источником света в виде щели, ширина которой меньше диаметра пятна на хроматограмме.

Таблица 6.5.

Выпускаемые промышленностью денситометры

Наименование	Фирма
Joyce-Loebl Chromoscan with Thin Layer Attachment Photovolt Densitometer Model 300	Joyce-Loebl & Co., Ltd., Team Valley, Gateshead County Durham, England Photovolt Corp., 1115 Broadway, New York, N.Y. 10010
Camag-Turner Fluorometer Vitatron Densitometer TLD 100 Flying Spot Scanner	Camag A.G., MuttENZ, Switzerland Vitatron N.V., Spoorstraat 23, Dieren, The Netherlands
Aminco Motorized Thin Film Scanner Nester-Faust Uniscan 900	American Instrument Co., Silver Spring, M. 20910 Nester/Faust Manufacturing Corp., 2401 Ogletown Road, Newark, Del. 19711
Schoeffel Model SD-3000	Schoeffel Instrument GmbH., 2351 Trappenkamp, C. Strasse 2, W. Germany
Vis-UV Chromatogram Analyzer	Farrand Optical Co., Inc., 535 South 5th Ave, Mount Vernon, N.Y. 10550
Chromatogram Spectrophotometer PMQ	Carl Zeiss, Oberkochen/Wuertt., W. Germany

В случае толстых слоев или непрозрачных подложек следует использовать метод измерения в отраженном свете. При этом на результат может влиять рассеянный свет. При работе в проходящем свете рассеянный свет не измеряется, и при использовании пластинок с го-товым слоем силикагеля фирмы "Merck", как это видно из табл. 6.3 и 6.4, получают очень хорошие результаты. Чтобы убедиться в том, что выбранные пластинки имеют равномерную толщину слоя, их предварительно проверяют в денситометре. Обычно при применении денситометрии стандартное отклонение составляет 2-5%.

6.11.5. Метод флуориметрии

Под флуориметрией понимают: а) измерение флуоресценции, при котором флуоресцирующее пятно на темном, нефлуоресцирующем фоне сканируют ультрафиолетовым источником света, имеющим обычно максимум эмиссии при 366 нм, и б) гашение флуоресценции, при котором поглощающее в УФ-области соединение, видимое как темное пятно на ярком флуоресцирующем фоне, сканируют источником ультрафиолетового излучения, имеющим максимум эмиссии при 254 нм.

Приготовление хроматограмм, механизм сканирования и интерпретация результатов такие же, как описанные для денситометрии. Вещества, имеющие природную флуоресценцию, как, например, полиадерные ароматические углеводороды, можно определять достаточно точно со стандартным отклонением примерно 2%. Поскольку неточная методика опрыскивания образца здесь исключается, то главным источником ошибок является неточность в нанесении образцов. Предел определения очень низкий (для некоторых соединений порядка 100 нг). Некоторые классы соединений, прежде чем их можно будет определять в виде флуоресцирующих пятен, следует опрыскивать флуорогенным реактивом, например пинакриптолом желтым в случае сульфоноватов. Включение стадии опрыскивания увеличивает стандартное отклонение вплоть до 5% /37/.

Точность метода измерения гашения флуоресценции ниже, чем точность прямого измерения флуоресценции, и стандартные отклонения /38, 39/ составляют 4–7%. Чувствительность метода гашения хуже, чем чувствительность, достигаемая при использовании большинства обычных обнаруживающих реагентов, и примерно равна 5–10 мкг. Как и в случае измерения флуоресценции, в зависимости от того, происходит гашение без предварительного опрыскивания или после опрыскивания флуорогенными реагентами, например родамином В можно различить два случая /40/.

Для прямой флуориметрии хроматограмм используют прибор "Camag-Turner TLC Scanner" (Camag. Muttentz, Switzerland), описание и характеристики которого даны в работе /37/.

6.11.6. Спектрофотометрические измерения по методу отражения

Естественным расширением методов денситометрии и флуориметрии является возможность записать спектры ультрафиолетового поглощения, ультрафиолетовой флуоресценции и поглощения в видимой области спектра разделенных веществ непосредственно на слое. Преимущество такого метода заключается в том, что неразделенные вещества, например стереоизомеры, можно определить в присутствии друг друга, если их спектры существенно отличаются. Подходящие

спектры можно получить на образцах, содержащих всего 1–5 мкг вещества. Поэтому этот метод измерения по меньшей мере в 10 раз более чувствителен, чем соответствующие определения после выделения вещества из адсорбента.

Фродима и др. /41/ описали конструкцию и методику использования ячейки, в которую можно помещать пятно адсорбированного вещества для дальнейших определений с помощью спектрометра модели ДК–2 (Model DK-2) со стандартной приставкой для измерений по методу отражения.

Прибор для автоматической записи (табл. 6.5), позволяющий записывать спектры в области 200–2500 нм, т.е. от УФ–области до ближней ИК–области, был разработан К.Цейсом вместе со Шталем и Йорком /42/.

6.11.7. Методы измерения по радиоактивности

Радиоактивные изотопы часто используют для изучения протекания химических реакций. Качественное и количественное распределение компонентов в реакционной смеси можно исследовать с помощью ТСХ. Общий обзор использования методов радиоактивных изотопов в ТСХ дан Мангольдом /59/. Для детектирования радиоактивных изотопов на пластинках имеется три главных способа:

1. *Авторадиография*. Кусок пленки, чувствительной к α -, β -, γ -или рентгеновским лучам, кладут на проявленную хроматограмму. Радиоактивные пятна появляются в виде темных зон на проявленной пленке, которая затем оценивается денситометрически. Главным недостатком метода являются большие времена экспозиции пленки, меняющиеся от нескольких часов до нескольких недель в зависимости от уровня радиоактивности.

2. *Непосредственное сканирование хроматограммы*. Хроматограмму сканируют радиационночувствительным устройством, например газопоточным пропорциональным счетчиком или счетчиком Гейгера – Мюллера, с целью получения записи, аналогичной получаемой в денситометрии. Примером прибора, в котором используется газопоточный детектор и производится автоматическое перемещение пластинок и запись количественных данных, является разработанный Шульцем и Вензелем /43/ и выпускаемый фирмой "Дезага" ("Desaga") Thin-Layer Scanner. Этот прибор испытан Вильде /44/, а влияние условий измерения исследовано Вудом /60/, указавшим, что для получения оптимальных результатов главными требованиями являются: 1) низкая скорость сканирования, позволяющая записывать максимальное число распадов; 2) узкая щель, необходимая для максимального разделения пика, и 3) минимальное расстояние между хроматограммой и детектором, способствующее улучшению разрешения и эффективности детектора. В настоящее время отсутствуют какие-либо точные данные о прямом количественном сканировании радиоактивных пятен.

Согласно Мангольду, этот метод имеет низкую чувствительность из-за высокого самопоглощения радиации и "мягкости" (стеклянной) подложки и поэтому ненадежен в качестве количественной методики. Преимуществом метода является возможность использования хроматограмм для опрыскивания обычными химическими реагентами после проведения сканирования радиоактивности.

3. Измерение радиоактивности с помощью жидкостных сцинтилляционных счетчиков. В этой методике часть адсорбента соскабливается в пузырек (это может быть сделано автоматически с помощью зоннальных скребков) /45/ и смешивается с раствором сцинтиллятора. Активность полученной суспензии определяется с помощью сцинтилляционного счетчика. Разрешение зависит от ширины полосы адсорбента, взятой для измерения, и недостатком метода является необходимость взятия большого числа проб в тех случаях, когда нужно исследовать всю длину хроматограммы.

6.12. ИЗВЛЕЧЕНИЕ РАЗДЕЛЕННОГО ВЕЩЕСТВА ИЗ СЛОЯ АДсорбЕНТА

6.12.1. Введение

Эффективную идентификацию сложных смесей можно проводить, объединяя жидкостную хроматографию с другими чувствительными инструментальными методами. Исследование фракций, полученных в результате хроматографических разделений, может проводиться с целью дальнейшего разделения, проведения количественного анализа и идентификации разделенных веществ.

Конечно, эффективность хроматографического разделения улучшается по мере уменьшения образца, однако, к счастью, в настоящее время разработаны чувствительные аналитические приборы, позволяющие проводить измерения на очень малых количествах материала. В табл. 6.6 приведены некоторые типичные требования, предъявляемые к образцам при применении различных аналитических методов. Таблица показывает совместимость метода хроматографии с каждым в отдельности и сразу с несколькими инструментальными методами.

При объединении хроматографического анализа с перечисленными методами возникают следующие проблемы: загрязнение растворенного вещества, неполное извлечение его из слоя неподвижной фазы и неудобство работы с малыми образцами. Хотя все это в равной степени применимо и к хроматографии в колонке, и к хроматографии в слое, но более наглядно видно на примере ТСХ, и поэтому в дальнейшем мы будем говорить именно об этом методе. Применимость высказываемых соображений к хроматографии в колонке вполне очевидна.

Проблема исключения загрязнений является главной. Так, например, чтобы получить ИК-спектр на 10 мкг растворенного вещества

(имеющиеся в продаже приборы и техника эксперимента в настоящее время позволяют сделать это), надо быть уверенным, что содержание примесей не превышает 0,5 мкг (т.е. 5%). Это означает, что растворенное вещество должно быть полностью выделено с чистого

Таблица 6.6.

Типичные размеры образцов, необходимые для исследования различными аналитическими методами

Методы анализа	Вес образца, мкг
Адсорбционная хроматография в тонком слое	20
Адсорбционная жидкостная хроматография в колонке	1 000
Распределительная газовая хроматография в наполненных колонках	100
Распределительная газовая хроматография в капиллярных колонках	1
УФ-спектроскопия (абсорбционная)	50
УФ-спектроскопия (флуоресцентная)	1
Масс-спектрометрия с прямым введением пробы	20
ЯМР-спектроскопия	10 000
ИК-спектроскопия (микротаблетка KBr)	20
Определение молекулярного веса	10 000
Анализ C, H, N	1 000
Атомноабсорбционная спектроскопия	10
Флуоресцентная рентгеновская спектроскопия	10 000
Импульсная полярография	1
Микрокулонометрия (S, N)	1

адсорбента путем элюирования не более чем 0,5 мл летучего растворителя, содержащего меньше 1 мг·л⁻¹ нелетучего материала. Более того, с растворенным веществом следует работать таким образом, чтобы оно не захватило дополнительных примесей из металлических узлов и атмосферы лаборатории до тех пор, пока не будет записан его спектр.

6.12.2. Чистота адсорбента

В работе /46/ показано, что количество органических примесей в силикагеле в настоящее время находится на том же уровне, что и в 1962 г., когда органические примеси впервые были исследованы Хонеггером /47/. Во множестве статей (например, /48/) все это время говорилось о влиянии этих загрязнений, особенно в тех случаях, когда используются чувствительные методы спектроскопии

или газовая хроматография. Органические примеси могут быть введены в адсорбенты: а) в процессе производства адсорбентов, б) из пластмассовых контейнеров, в которых поставляется большинство адсорбентов, и в) из атмосферы. Кроме того, в адсорбентах почти всегда присутствуют неорганические примеси. Например, в большинстве силикагелей содержится железо. Положение еще больше осложняется при введении в адсорбенты добавок (таких, как органические и неорганические связующие), улучшающих свойства слоя или действующих как индикаторы. Мы нашли, что силикагель НН является достаточно чистым адсорбентом, чтобы его можно было использовать со всеми дополнительными методами, которые применяются в лаборатории авторов, но хранить его надо в чистом стеклянном контейнере, не допуская попадания воздуха. Силикагель НН 254 также можно использовать в тех случаях, когда возможные загрязнения присутствующими в силикагеле неорганическими фосфорами не вызывают осложнений. Присутствие фосфоров, конечно, помогает определению положения пятен на хроматограмме. Однако силикагель НН 254 поставляется в пластмассовых контейнерах. Поэтому следует испытывать каждую партию на присутствие органических загрязнений, и если адсорбент обладает удовлетворительными свойствами, перенести его для хранения в герметически закрытую стеклянную бутылку. Все пластинки с готовыми слоями, испытанные до сих пор, содержали значительное количество загрязнений. Особенно непригодны пластмассовые листы, так как содержащиеся в подложке пластификаторы стремятся адсорбироваться на адсорбенте.

6.12.3. Требования, предъявляемые к растворителю

Используемый для элюирования из силикагеля растворитель должен быть достаточно чистым, иметь соответствующую элюирующую силу (см. табл. 3.5) и другие свойства. Безусловно, растворенное вещество должно быть растворимо в растворителе и не должно реагировать с ним. В выбранной системе адсорбент — подвижная фаза растворитель должен иметь такую элюирующую силу, чтобы значение

R_F растворенного вещества составляло 0,8 или больше. Свойства и чистота растворителя во многом определяются методом, которым в дальнейшем будет исследоваться растворенное вещество. Например, при исследовании вещества в ультрафиолетовом свете растворитель должен быть прозрачен в этой области длин волн, а при идентификации растворенных веществ методом ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии необходимо, чтобы в растворителе отсутствовали нелетучие материалы. Даже многие растворители, имеющие квалификацию "для аналитических целей", содержат большие (т.е. больше, чем 1 мг л^{-1}) количества нелетучих материалов, и их следует перегонять в стеклянной аппаратуре непосредственно перед использованием. По-

межи дают и обычно рекомендуемые растворители: хлороформ и эфиры (диэтиловый, диизопропиловый) тетрагидрофуран. Как было установлено, многие партии хлороформа содержат пластификатор, а эфиры содержат ингибиторы, предотвращающие образование перекисей. Спирты экстрагируют мелкие частицы силикагеля, образуя коллоидную дисперсию, и поэтому их нельзя использовать для спектрального анализа.

Часто встречающейся проблемой является неполное вымывание растворенного вещества из адсорбента. При серийном количественном анализе, например с помощью УФ-спектроскопии, это не имеет значения, так как извлечение является воспроизводимым, а для сравнения аналогичной обработке подвергается стандартное вещество, которое ведет себя точно так же. Однако в качественном анализе необходимо учитывать плохое извлечение. Возможными причинами плохого извлечения являются: а) неаккуратное нанесение образца, б) хемосорбция, в) присутствие в смеси таких компонентов, наличие которых нельзя было предположить, г) потери, обусловленные летучестью компонентов образца, и д) плохая методика работы.

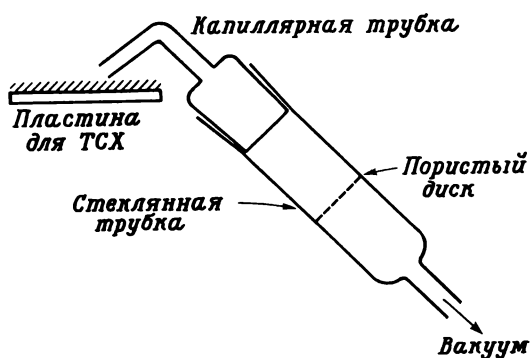
6.12.4. Методика обращения с образцом

Все операции должны выполняться в чистой атмосфере. Первым необходимым условием является абсолютная чистота всех металлических предметов. Наиболее эффективный способ очистки стеклянных предметов включает следующие операции: подлежащий очистке предмет погружают на 30 мин в 5%-ный раствор органического детергента в ультразвуковой бане, после чего промывают дистиллированной водой и высушивают в чистой, свободной от пыли печи. Хромовая кислота в этих условиях не относится к числу эффективных очищающих агентов.

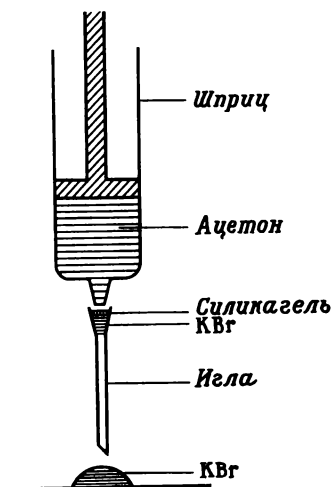
Каким будет разделение – обычным аналитическим или препаративным, определяется природой образца и его количеством. Следует учитывать, что разделение ухудшается с увеличением количества образца, а вещество, подлежащее дальнейшему исследованию, должно быть выделено в чистом виде. Довольно сложно бывает определить положение разделенного вещества. Однако удивительно, что при рассмотрении пластинки в отраженном свете очень многие “бесцветные” растворенные вещества можно различить в виде затемненных или опалесцирующих зон. Флуоресцирующие вещества можно детектировать, рассматривая их под длинноволновым ультрафиолетовым светом (3660 Å), в то время как поглощающие в УФ-области вещества можно определить по их гасящему эффекту во флуоресцирующем слое на силикагеле HF254, если пластинку рассматривать в коротковолновом ультрафиолете (2540 Å). Если все эти методы потерпят неудачу, то на одном конце пластинки следует хроматографировать вещество срав-

нения. Оставшаяся часть пластинки закрывается и образец сравнения опрыскивается вызывающим появление окраски реагентом, предпочтительно тем, который реагирует немедленно и при комнатной температуре. Для этой цели целесообразно использовать 1%-ный раствор иода в хлороформе. При проявлении хроматограммы следует избегать появления "краевого" эффекта, иначе значения R_F пятен в середине пластинки будут ниже, чем R_F образца, взятого для сравнения. Поэтому проявление необходимо проводить в С-камере.

Если образец нанесен в виде полосы, то растворенное вещество, пропитывающее адсорбент, лучше всего удалить с помощью "вакуумного очистителя", многие варианты которого описаны в литературе, а один из вариантов показан на рис. 6.13.



Р и с. 6.13. Устройство для удаления адсорбента с пластинки для ТСХ.



Р и с. 6.14. Прибор для переноса пятна образца с адсорбента на КВг [46].

Выделение и идентификация небольших (< 10 мкг) образцов проводятся следующим образом: 40 мкл 5%-ного раствора образца наносят в виде короткой полосы (2 см) на пластинку для ТСХ размером 5 x 20 см, покрытую силикагелем HR с толщиной слоя 750 мкм; 2 мкл 1%-ного раствора того же образца хроматографируют рядом и используют для сравнения. Хроматограмму проявляют в С-камере, применяя подвижную фазу, содержащую менее чем 10^{-4} % нелетучего остатка, и хроматограмму сравнения (2 мкл образца) опрыскивают раствором иода, чтобы можно было указать положение разделен-

ной полосы в большом образце. Полоса вещества, подлежащего исследованию, соскабливается микрошпателем, помещается поверх небольшого количества порошка КВг в канюле иглы для шприца и утрамбовывается (рис. 6.14). КВг служит в качестве фильтра для предотвращения прохождения мелкого силикагеля через иглу. Стекланный шприц емкостью 1 мл заполняется чистым ацетоном, соединяется с иглой, и вещество элюируют по каплям. Обычно, чтобы вымыть все растворенное вещество, достаточно примерно 20 капель.

6.13. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ МЕТОДОВ

6.13.1. Спектрофотометрия

Спектрофотометрия является наиболее общим методом, используемым в ТСХ, поскольку спектрофотометр входит в стандартное оборудование, имеющееся в большинстве лабораторий. По сравнению с денситометрией это более длительный и трудоемкий метод; чтобы исключить загрязнения и получить воспроизводимые извлечения, необходимо быть очень внимательным. Тем не менее во многих статьях указывается, что пределы стандартных отклонений составляют 3–5%, а в некоторых случаях даже меньше. Сравнивая спектрофотометрию с денситометрией, некоторые исследователи пришли к выводу, что точность этих двух методов одинакова /49, 50/.

При выборе размера начального образца учитывают чувствительность метода, т.е. коэффициент погашения и длину ячейки, и пределы концентрации, в которых выполняется закон Ламберта – Бера. Хроматограмму проявляют обычным способом, определяют положение разделенного вещества и адсорбент переносят в зависимости от его количества в одно из устройств для вымывания, описанных в разд. 6.12.4. Вещество вымывают чистым летучим растворителем в круглодонную склянку емкостью 5 мл, из которой растворитель удаляют осторожным испарением на водяной бане в токе азота. Вещество вновь растворяют, но в таком растворителе, который не препятствует последующему спектрофотометрическому определению. Раствор переносят, используя для этого медицинский шприц, в мерную колбу, добавляют, если нужно, окрашивающий реагент и доводят объем до необходимого. О том, как проводятся колориметрические измерения, подробно говорится в стандартных методиках спектрофотометрического анализа, см., например, работу /51/. Концентрацию разделенного вещества в исходном образце определяют после установления соотношения между поглощением и весом вещества в растворе сравнения.

Преимущество спектрофотометрии обусловлено тем, что форма кривой поглощения может служить основой для идентификации разделенного вещества. Ошибки определения вызываются главным образом присутствием загрязнений (т.е. в основном веществами, содержащи-

мися в адсорбенте), неполным извлечением, а также тем обстоятельством, что рассматриваемый метод является длительным и трудоемким. Поскольку примеси поглощают главным образом в УФ-области, обычно лучше проводить измерения в видимой части спектра.

Разработана также методика получения на пластинке путем опрыскивания окрашенных соединений, растворяющихся лучше, чем исходные, но мы ее не рекомендуем, так как реагент для опрыскивания может не проникнуть через адсорбент и не прореагировать со всем разделенным веществом.

6.13.2. Флуоресценция в УФ области

Перенесение образца для последующего измерения осуществляется так же, как в случае измерения поглощения в УФ-области, но из-за большей чувствительности метода следует принять специальные меры предосторожности для исключения флуоресцентных примесей. Поскольку измерения проводятся на очень маленьком образце, используют обычное аналитическое разделение. Поэтому образец и раствор сравнения могут быть хроматографированы на одной и той же пластинке. Соскабливая небольшое количество силикагеля вблизи одного из пятен образца и проводя полностью операцию вымывания, можно получить холостую вытяжку из адсорбента. При работе с маленькими образцами лучше использовать микрошприцы. Согласно литературным данным, стандартные отклонения составляют от 2 до 15%, что, вероятно, отражает трудности, связанные с исключением загрязнений.

Такая методика широко применялась Савицки и др. /52/ при изучении атмосферных загрязнений. В работе был использован спектрофлуориметр "Aminco-Bowman".

6.13.3. Другие хроматографические методики

Разделение сложной смеси может потребовать повторного разделения с использованием иного механизма. В этом случае первой полезной ступенью разделения является грубое фракционирование веществ по различным функциональным группам методом адсорбционной хроматографии в тонком слое, причем при этом должна быть использована вся высокая емкость образца адсорбента. Разделенные зоны вещества соскабливают, удаляют с адсорбента и далее разделяют методом газожидкостной распределительной хроматографии (если компоненты летучи) или высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полимеры можно исследовать также методом ситовой или пиролитической газовой хроматографии.

Несколько групп исследователей использовали обратный порядок процессов разделения, например, хроматографирование в тонком слое проводили после разделения методом газовой хроматографии, но, вероятно, такое изменение порядка процесса не всегда является целе-

сообразным. С общим обзором этого вопроса можно познакомиться в работе Кайзера /61/. Пластика для ТСХ помещается на расстоянии 1 мм от выходного отверстия газового хроматографа, и к отверстию прикрепляется игла шприца. Движение пластики для ТСХ можно запрограммировать таким образом, чтобы индивидуальные пики газового хроматографа наносились на различные части пластики для ТСХ. Нанесенные образцы хроматографируются обычным способом. Таким образом, разделенные вещества характеризуются по удельному живанию, а также с помощью значения R_F и цветных реакций. Однако эффективность переноса вещества от газового хроматографа на пластинку для ТСХ обычно плохая (30–80%). В недавно опубликованном исследовании /53/ рассматривается разделение в тонком слое продуктов конденсации (2,4-динитрофенилгидразонов, семикарбазонов), образованных непосредственно на слое из летучих карбонильных соединений, выходящих из газохроматографической колонки. Аналогичным образом были исследованы спирты, образующие 3,5-динитробензоаты или *o*-нитрофенилуретаны.

6.13.4. Инфракрасная спектроскопия и масс-спектрометрия

Использование этих методов наряду с жидкостной хроматографией позволяет проводить эффективную идентификацию компонентов сложных смесей. Поскольку для получения и ИК- и масс-спектра требуется небольшое количество разделенного компонента (меньше 20 мкг), то после разделения методом хроматографии в тонком слое для перенесения образца используют описанную выше методику для работы со шприцем. Чтобы по возможности уменьшить загрязнение образца при его обработке и перенесении в прибор, необходимо свести до минимума количество используемого элюента. Если необходимо получить ИК-спектр, стеклянный шприц (см. рис. 6.14) заполняют подходящим элюентом (обычно ацетоном) и вещество вымывают через иглу по каплям на слой измельченного и высушенного порошка КВг весом 10 мг. Перед добавлением каждой капли растворителя дают полностью испариться. Чтобы перевести все адсорбированное вещество из силикагеля на КВг, обычно достаточно примерно 20 капель. Порошок КВг с веществом перемешивают микрошпателем и прессуют в таблетку диаметром 1,5 мм.

Используя 5–30 мкг вещества, можно получить отличные спектры на ИК-спектрометре "Perkin-Elmer 521", снабженном устройством для микрообразцов и конденсором луча. Наличие такого устройства увеличивает длину хода луча через образец. Компенсация достигается путем введения частично вакуумированной (500 мм рт. ст.) однометровой газовой ячейки и аттенюатора в луче сравнения.

При получении масс-спектра разделенного вещества десорбированный раствор вводят шприцем через прокладку непосредственно в устройство для ввода образца в масс-спектрометр.

6.13.5. Детектирование с помощью пламенно-ионизационного детектора

Этот метод определения описан Коттривом и Лайнесом /54/. Компоненты образца, разделенные на пластинке ТСХ, последовательно пиролизировались медленно передвигающимся пламенем в токе азота, который переносил продукты пиролиза в пламя ионизационного детектора. Каждая зона записывалась на ленте самописца в виде пика, площадь которого пропорциональна количеству присутствовавшего материала. Работа была выполнена с образцами растворенного вещества по 0,3 мг каждый на пластинках размером 25 x 12 мм, покрытых силикагелем Н. Несмотря на некоторый успех, в методике остается ряд нерешенных проблем: а) распространение метода на пластины ТСХ обычного размера, б) улучшение разделения, в) увеличение чувствительности, г) исключение загрязнений примесями из адсорбента и из растворителей, д) увеличение скорости сканирования.

Однако следует отметить, что эта методика позволяет быстрее получить более надежные результаты, чем другие деструктивные количественные методики, такие, как денситометрия.

Аналогичный прибор описан в работе /55/. Разделение выполняется на тонкой стеклянной трубке (диаметром 0,45 мм), покрытой слоем адсорбента. После проявления хроматограммы компоненты детектируют, пропуская трубку через пламя пламенно-ионизационного детектора со скоростью 35 см·мин⁻¹. Выходной сигнал детектора записывается на ленточном самописце.

6.14. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В этой главе мы увидели, что ТСХ является простым методом, использующим дешевое оборудование и материалы. Этот метод позволяет быстро проводить не слишком сложные разделения и при разумном использовании обнаруживающих реагентов и значений R_F является хорошим аналитическим методом качественного анализа функциональных групп. Однако при расширении области применения ТСХ для более сложных разделений становятся заметными ограничения этого метода, и он проигрывает при сравнении с недавно развитым методом высокоэффективной высокоскоростной хроматографии в колонках, который позволяет более просто контролировать экспериментальные переменные и который, кроме того, можно автоматизировать.

При использовании ТСХ для количественного анализа непропорционально увеличиваются усилия и стоимость дополнительного оборудо-

дования, необходимые для получения результатов, которые можно рассматривать только как полуколичественные. Количественное хроматографирование методом ЖХ в будущем почти наверняка будет выполняться на хроматографах точно так же, как это делается в настоящее время в газовой хроматографии. Хроматография в тонком слое, по-видимому, должна служить мостом между классической хроматографией, выполняемой в коротких широких трубках, и новой высокоскоростной, высокоэффективной хроматографией в колонках, которой посвящена следующая глава. Тем не менее набор инструментов для ТСХ наряду с аналитическими весами, рН-метром, ИК-спектрометром и газовым хроматографом должен входить в стандартное оборудование любой современной аналитической лаборатории.

Список литературы

1. Izmailov N.A., Shraiber H.S., Farmatsiya, **3**, 1 (1938).
2. Consden R., Gordon A.H., Martin A.J.P., Biochem. J., **38**, 224 (1944).
3. Kirchner J.G., Miller J.M., Ind. Eng. Chem., **44**, 318 (1952).
4. Kirchner J.G., Miller J.M., J. Agr. Food Chem., **1**, 512 (1953).
5. Kirchner J.G., Miller J.M., Keller G.I., Anal. Chem., **23**, 420 (1951).
6. Miller J.M., Kirchner J.G., Anal. Chem., **24**, 1480 (1952); **20**, 2002 (1954).
7. Stahl E., Pharmazie, **11**, 633 (1956).
8. Stahl E., Chemiker Z., **82**, 323 (1958).
9. Pelik N., Bolliger H.R., Mangold H.K., Advan. Chromatog., **3**, 85 (1966).
10. Fairbairn J.W., Relph S.J., J. Chromatog., **33**, 494 (1968).
11. Peifer J.J., Mikrochim. Acta, **1962**, 529.
12. De Zeeuw R.A., Anal. Chem., **40**, 2134 (1968).
13. Korzun B.P., Brody S., J. Pharm. Sci., **53**, 454 (1964).
14. Brenner M., Niederwieser A., Experientia, **17**, 237 (1961).
15. Halpaap H., Chem. Ing. Tech., **35**, 488 (1963).
16. Killer F.C.A., Amos R., J. Inst. Pet., **52**, 315 (1966).
17. Wieland T., Determan H., Experientia, **18**, 431 (1962).
18. Niederwieser A., Brenner M., Experientia, **21**, 50 (1965).
19. De Zeeuw R.A., Anal. Chem., **40**, 915 (1968).
20. Niederwieser A., Honegger C.G., Advan. Chromatog., **2**, 123 (1966).
21. Niederwieser A., Chromatographia, **2**, 23, 362 (1969).
22. Snyder L.R., Saunders D.L., J. Chromatog., **44**, 1 (1969).
23. Stahl E., J. Chromatog., **33**, 273 (1968).
24. Dallas M.S.J., J. Chromatog., **17**, 267 (1965).
25. Giddings J.C., Keller R.A., J. Chromatog., **2**, 626 (1959).
26. Brenner M., Niederwieser A., Experientia, **16**, 378 (1960).
27. Purdy S.J., Truter E.V., Analyst, **87**, 802 (1962).
28. Goldman J., Goodall R.R., J. Chromatog., **32**, 24 (1968); **40**, 345 (1969).
29. Latner A.L., Molyneux L., Dudfield Rose J., J. Lab. Clin. Med., **40**, 345 (1969); **43**, 157 (1954).

30. Dallas M.S.J., *J. Chromatog.*, **33**, 537 (1968).
31. Shellard E.J., Alam H.Z., *J. Chromatog.*, **33**, 347 (1968).
32. Amos R., *J. Inst. Pet.*, **54**, 9 (1968).
33. Brain K.R., Hardman R., *J. Chromatog.*, **38**, 355 (1968).
34. Dobies R.S., *J. Chromatog.*, **40**, 110 (1969).
35. Heathcote J.G., Haworth C., *J. Chromatog.*, **43**, 84 (1969).
36. Favretto L., Pertoldi Marletta G., Favretto Gabrielli L., *J. Chromatog.*, **46**, 255 (1970).
37. Janchen D., Pataki G., *J. Chromatog.*, **33**, 391 (1968).
38. Pataki G., Niederwieser A., *J. Chromatog.*, **29**, 133 (1967).
39. Zurcher H. Pataki G., Borko J., Frei R.W., *J. Chromatog.*, **43**, 457 (1969).
40. Sawicki E., Johnson H., *J. Chromatog.*, **23**, 142 (1966).
41. Frodyma M.H., Frei R.W., *J. Chem. Ed.*, **46**, 522 (1969).
42. Stahl E., Jork H., *Zeiss Information*, **68**, 52 (1968).
43. Schulze P.E., Wenzel M., *Angew. Chem., Intern. Ed.*, **1**, 580 (1962).
44. Wilde P.F., *Thin Layer Chromatography*, Unit Trade Press London, 1964, p. 29.
45. Snyder F., *Anal. Biochem.*, **9**, 182 (1964); **11**, 510 (1965).
46. Amos R., *J. Chromatog.*, **46**, 343 (1970).
47. Honegger C.G., *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1409 (1962).
48. Shellard E.J., Alam M.Z., *J. Chromatog.*, **32**, 472 (1968).
49. Shellard E.J., Alam M.Z., *J. Chromatog.*, **35**, 72 (1968).
50. Graham R.T.J., Bark L.S., Tinsley D.A., *J. Chromatog.*, **39**, 218 (1968).
51. Siggia S., *Quantitative Organic Analysis*, Wiley, New York, 1963.
52. Sawicki E., Stanley J.W., Elbert W.C., Pfaff J.D., *Anal. Chem.*, **36**, 497 (1964).
53. Tumlinson J.H., Minyard J.P., Hedin P.A., Thompson A.C., *J. Chromatog.*, **29**, 80 (1967).
54. Cotgreave T., Lynes A., *J. Chromatog.*, **30**, 117 (1967).
55. Padley F.B., *J. Chromatog.*, **39**, 37 (1969).
56. Amos R., *J. Anal. Chem.*, **236**, 350 (1968).
57. Stahl E., (ed.), *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 2nd ed., 1967.
58. Kirchner J.G., in "Technique of Organic Chemistry", Vol. XII, Perry E.S., Weissberger A., eds, Wiley-Interscience, New York, 1967.
59. Mangold H.K., *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 2nd ed., 1967.
60. Wood B.A., in "Quantitative Paper and Thin Layer Chromatography", Shellard E.J., ed., Academic Press, London and New York, 1968.
61. Kaiser R., *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 2nd ed., 1967.

Список дополнительной литературы

Stahl E. (ed.), *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 2nd ed., 1967 (English edition, 1969); Kirchner J.G., *Thin*

- layer chromatography, in "Technique of Organic Chemistry", vol. XII, Perry E.S., Weissberger A., eds, Wiley-Interscience, New York, 1967. В этих двух книгах даны обзоры методов ТСХ и рассматривается применение ТСХ вплоть до 1966 г.
- Shellard E.J. (ed.), Quantitative Paper and Thin Layer Chromatography, Academic Press, London and New York, 1968. Труды симпозиума, рассмотревшего современное развитие различных количественных методов в хроматографии на бумаге и в тонком слое.
- Snyder L.R., R_F values in thin-layer chromatography on alumina and silica, in "Advan. Chromatog.", 4, 3 (1967). Излагается проверенная с использованием литературных данных общая теория корреляции и предсказания значений R_F в ТСХ.
- 3rd International Symposium on Reproducibility in Paper and Thin Layer Chromatography, J. Chromatog., 32, 1 – 409 (1968). Приведены оригинальные статьи и обзоры, в которых рассматриваются факторы, влияющие на значения R_F , а также количественные методы анализа.

7.1. ВВЕДЕНИЕ

Еще сравнительно недавно оборудование для жидкостной хроматографии было относительно простым. Для уплотнения слоя неподвижной фазы в колонке-стеклянной трубке – использовался вибратор, для введения образца в верхнюю часть колонки, вероятно, применялся шприц, элюент на выходе из колонки собирался с помощью коллектора фракций. Совершенно иная картина наблюдается в наши дни. К концу 1970 г. в продаже появились комплекты жидкостные хроматографы стоимостью от 2 до 20 тыс. долл., цена которых отражает стоимость различных вновь разработанных и часто сложных узлов, входящих в современную совершенную систему жидкостного хроматографа.

Поскольку совершенствование оборудования в настоящее время происходит быстрыми темпами, в данной главе главным образом обсуждаются принципы действия основных узлов хроматографа и возможности их совершенствования. Эта глава может быть также использована как справочник по оборудованию, поскольку она содержит приложение, в котором приводятся данные о некоторой новейшей аппаратуре для хроматографии в колонке.

При обсуждении техники современной хроматографии в колонке мы уже отмечали, что отличает ее от традиционной техники. Эти характерные черты для удобства можно сгруппировать следующим образом:

1. Гидравлическая система: создание и измерение сравнительно высоких давлений, необходимых для высокоскоростной эффективной жидкостной хроматографии.
2. Устройство для градиентного элюирования: создание элюентов с характеристиками, изменяющимися в процессе проявления хроматограммы.
3. Ввод образца: введение образцов в жидкостной хроматограф должно осуществляться таким способом, чтобы размывание полосы было минимальным.
4. Конструкция колонки: оптимальная геометрия, соединения и набивка колонок и их температурный контроль.

5. Контроль вытекающего потока: детектирование, идентификация и определение разделенных компонентов образца на выходе из колонки.

Все эти вопросы мы обсудим ниже. В 1969 г. были опубликованы два списка поставщиков оборудования /1, 2/; мы дополнили эти списки и поместили в приложения к данной главе.

Вероятно, уже в недалеком будущем станут доступными ком-плектные хроматографы, однако для успешной работы всегда необходимо понимать принцип работы отдельных узлов таких приборов.

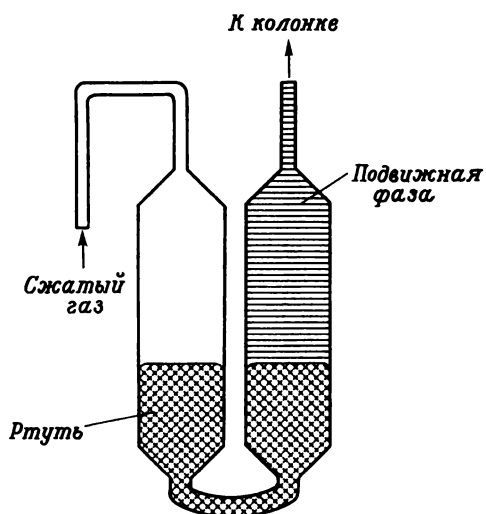
7.2. ГИДРАВЛИЧЕСКАЯ СИСТЕМА

Проницаемость длинных тонких колонок, заполненных очень мелкими частичками неподвижной фазы, мала. Чтобы достичь даже низких объемных скоростей потока (нормальный диапазон объемных скоростей потока $0,01-10 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$) элюента через такие колонки, давления на входе в колонку должны намного превышать величины, которые обеспечиваются традиционной подачей под действием силы тяжести. Такие повышенные давления можно создать, используя либо сжатый газ, либо соответствующие насосы.

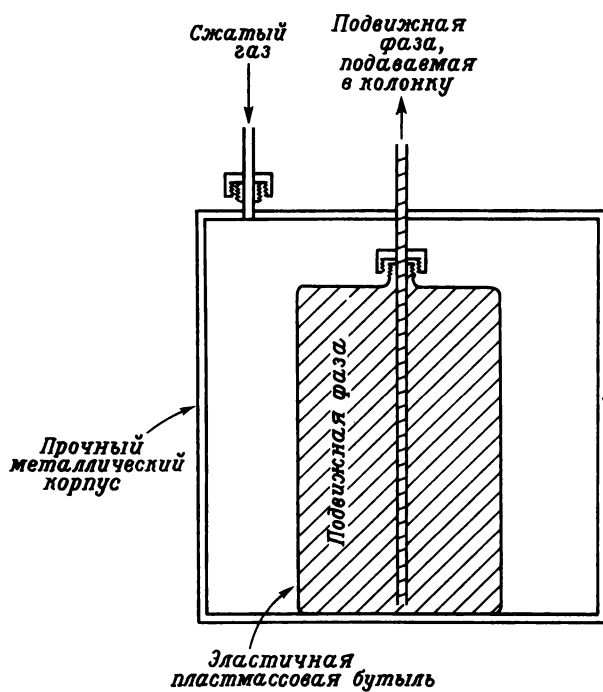
7.2.1. Использование сжатых газов

Давление сжатых газов в баллонах может превышать 100 атм, т.е. вполне достаточно для проведения эффективного хроматографирования колоночным методом. Используя сжатый газ, можно создавать в системе постоянное давление — это важная особенность метода. При работе плунжерного и диафрагменного насосов, которые обычно действуют периодически, давление пульсирует. Иными словами, элюент под действием сжатого газа течет плавно, скорость его не меняется, тогда как при использовании насоса осуществляется пульсирующая подача со скоростью, изменяющейся от нуля до максимального значения. Для демпфирования этих пульсаций требуется дополнительное оборудование, к тому же насосы стоят значительно дороже, чем устройства для подвода сжатого газа.

Однако газовый баллон высокого давления нельзя непосредственно присоединить к помещенному перед хроматографической колонкой резервуару с элюентом. Газ стал бы растворяться в элюенте, из которого он мог бы затем выделяться при прохождении через колонку. Пузырьки газа или пара в колонке приводят к образованию каналов и потере разрешения, что серьезно снижает качество разделения. Таким образом, следует предотвратить растворение газа в подвижной фазе; это достигается отделением газа от жидкости гибким, но непроницаемым барьером. До давлений вплоть до 5 атм эффективным и простым по конструкции способом является использование толсто-



Р и с. 7.1. Сосуд для передавливания с перегородкой из ртути.



Р и с. 7.2. Сосуд для передавливания с пластмассовой диафрагмой,

стенного стеклянного сосуда, содержащего в качестве границы раздела ртуть (рис. 7.1). В случае более высоких давлений такой сосуд для передавливания должен быть выполнен из металла. Ртуть не амальгамирует сталь и железо, поэтому сосуды можно изготавливать из этих материалов. Альтернативным подходом является использование пластиковой диафрагмы. В простейшей конструкции, применяемой по меньшей мере в двух типах имеющихся в продаже хроматографов, элюент помещается в полиэтиленовую бутылку, которая находится внутри стального автоклава. Сжатый газ подается в пространство между металлической оболочкой и бутылкой, как показано на рис. 7.2, и элюент постепенно вытесняется из бутылки в хроматографическую колонку.

Все системы со сжатым газом имеют следующий недостаток: общий объем элюента, который может быть подан в колонку одновременно, ограничен емкостью сосуда для передавливания и обычно составляет 0,1–1,0 л. Нет сомнения, что, несмотря на это и на отмеченное выше ограничение максимально возможного давления, большинство высокоэффективных хроматографических разделений можно выполнить с помощью этих простых и дешевых систем подачи.

7.2.2. Насосы

Хотя на химических заводах и в лабораториях используются насосы самых разных типов, только немногие из них применяются для колоночной хроматографии. Насосы некоторых типов могут подавать жидкость только против относительно низких противодавлений (до 5 или 10 атм) и поэтому непригодны в тех случаях, когда для оптимальной характеристики необходимы давления большие по меньшей мере на порядок. Ротационные насосы, которые могут подавать жидкости по существу без пульсаций, обычно непригодны для подачи небольших объемов при высоких давлениях; перистальтические насосы, которые также обеспечивают относительно устойчивые потоки жидкости, можно использовать только в системах с низким противодавлением. Таким образом, выбор насоса для высокоэффективной высокоскоростной хроматографии в колонке обычно ограничен различными машинами с принудительным вытеснением, в которых движущая сила создается движением плунжера, диафрагмы или сильфона. Насосы этих типов создают пульсирующий поток жидкости. Преимущество всех насосных систем над системами с использованием сжатых газов состоит в том, что объем элюента, который можно прокачать через систему без перерыва, неограничен. Поэтому насосы особенно подходят для повторяющегося автоматизированного хроматографирования в колонках.

Чтобы читатель мог выбрать для себя именно тот насос, который ему нужен, ниже мы обсудим достоинства и недостатки насосов

нескольких типов, хотя некоторые из них имеют ограниченную применимость.

7.2.3. Перистальтические насосы

В типичном перистальтическом насосе жидкость содержится в эластичной трубке, которая находится в контакте с изогнутой направляющей. Ротор, несущий несколько роликов, при вращении расплющивает трубку на направляющей, подавая жидкость вперед. Когда ролик проходит и трубка принимает свою обычную форму, в нее всасывается следующая порция жидкости, которая затем выталкивается следующим роликом. Перистальтические насосы имеют следующие преимущества: это самозаполняющиеся насосы с малой пульсацией, которые могут использоваться для подачи корродирующих жидкостей и параллельно питать несколько каналов (т.е. могут иметь несколько приводимых в движение одним ротором трубок, каждая из которых подает жидкость в отдельную колонку). Главный недостаток этих насосов заключается в том, что на практике максимальное давление не превышает 10 атм, кроме того, не исключена возможность загрязнения элюента пластификатором из эластичной трубки, а некоторые органические растворители нельзя подавать по пластиковым трубкам. Стоимость насосов этого типа составляет примерно 500 долл.

7.2.4. Насосы с возвратно-поступательным движением

В насосах этого типа, плунжерных, диафрагменных и сильфонных, под воздействием толкающего устройства (плунжера, диафрагмы или сильфона), совершающего возвратно-поступательное движение жидкость продавливается вперед серией импульсов.

Принципиальные особенности, характеризующие насосы этого типа, представлены в табл. 7.1.

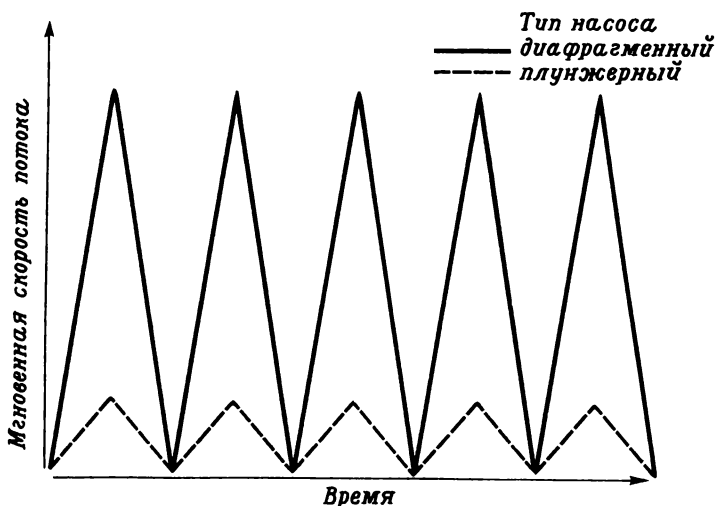
Таблица 7.1

Характеристики насосов с возвратно-поступательным движением

Тип насоса	Рабочее давление, атм	Тип потока	Средняя скорость потока при низких скоростях
Плунжерный	1-100	Пульсирующий	Непостоянна
Сильфонный	0,5-25	"	-
Диафрагменный	1-3 000	"	Постоянна

Приведенные в табл. 7.1 данные показывают, что сильфонные насосы мало пригодны для хроматографии в колонке из-за относительно низкого рабочего давления. По сравнению с плунжерным диафрагменный насос имеет два отчетливых преимущества: более высокий

диапазон давлений и – что более ценно – постоянную скорость при низких скоростях потока. Однако следует помнить, что основной поток, создаваемый любым насосом с возвратно-поступательным движением, является пульсирующим и, как правило, его необходимо демпфировать. Различие в профилях недемпфированных потоков, создаваемых плунжерным и диафрагменным насосами, схематически показано на рис. 7.3. Таким образом, для проведения высокоскорост-



Р и с. 7.3. Профили недемпфированного потока, создаваемого насосом.

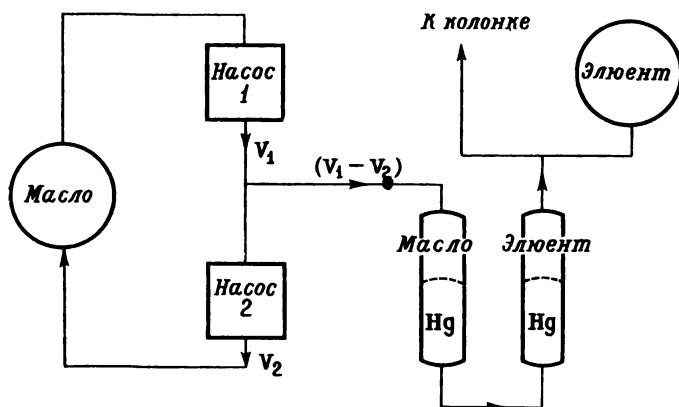
ного и высокоэффективного хроматографирования в колонке наиболее подходящими из доступных в настоящее время типов насосов являются диафрагменные насосы.

7.2.5. Ротационные насосы

В ротационных насосах жидкость захватывается между зубьями или лопастями пары роторов и вследствие этого проталкивается вперед практически непрерывным потоком без пульсаций. Однако с помощью этих насосов очень трудно получить низкие скорости потока (т.е. скорости, необходимые для колоночной хроматографии) даже при использовании вязких жидкостей, не говоря уже о подвижных фазах с низкой вязкостью, обычно применяемых в хроматографии.

Джонсон и Кентоу /3/ разработали остроумную систему для создания беспульсационного потока с постоянной (низкой) объемной

скоростью для хроматографии в колонке. Они использовали два шестеренчатых насоса с постоянной объемной скоростью, включенных по дифференциальной схеме. Насосы работали на минеральном масле с высокой вязкостью, это позволяло обеспечить необходимую постоянную скорость. Выдавливаемое масло использовалось для продавливания элюента через колонку, причем элюент был отделен от масла слоем ртути. Таким образом, эта часть системы напоминает описанную раньше систему для передачи давления сжатым газом, только создаваемые давления в данном случае могут быть более высокими и все оборудование сконструировано из стали. Упрощенная схема системы Джонсона и Кентоу показана на рис. 7.4.



Р и с. 7.4. Система дифференциальных ротационных насосов [3].

7.2.6. Насосы с постоянно толкающим поршнем

Вероятно, наиболее простая насосная система состоит из поршня, перемещаемого с постоянной скоростью в цилиндрическом резервуаре, содержащем подвижную фазу. Таким образом создается полностью свободный от пульсаций поток жидкости, проходящий через колонку с любой заданной скоростью.

Общий объем подвижной фазы ограничен емкостью цилиндрического резервуара. В свою очередь эта емкость ограничена размером и весом резервуара, а также максимально допустимой площадью поперечного сечения. Если последняя становится слишком большой, то могут возникнуть трудности в создании достаточно малой скорости движения цилиндра, которая требуется для того, чтобы обеспечить необходимые часто сравнительно низкие объемные скорости. Кроме того, емкость цилиндрического резервуара насоса ограничена из-за

трудности обработки больших поршней и цилиндров с необходимыми малыми допусками. В настоящее время емкость насосов такого типа, применяемых в жидкостной хроматографии, не превышает 1–2 л. В настоящее время представляется возможным добавлять в поток второй компонент, что позволяет проводить градиентное элюирование.

7.2.7. Методы демпфирования пульсирующих потоков

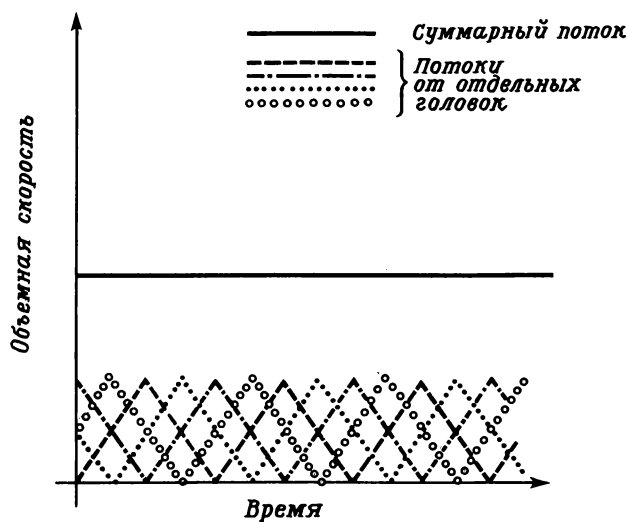
В оптимизированном процессе хроматографирования линейная скорость подвижной фазы должна оставаться постоянной или изменяться в соответствии с заданной программой. Насосы с возвратно-поступательным движением и (в гораздо меньшей степени) перистальтические насосы создают пульсирующие потоки, вследствие чего подвижная фаза перемещается при оптимальной скорости только небольшую часть времени. Флуктуации скорости необходимо сглаживать, для этого можно использовать несколько методов.

Для демпфирования пульсаций используются дифференциально работающие насосы, трубки Бурдона, "поршневые" демпферы и гидродинамические аккумуляторы.

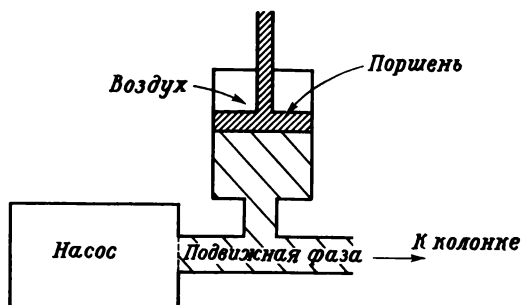
Если несколько насосов работают со смещением по фазе, поток может быть достаточно постоянным; однако стоимость такой системы сравнительно высока. Выпускаются различные варианты нагнетательных насосов со многими головками. В них несколько отдельных подающих головок одинаковой емкости соединены параллельно и приводятся в действие одним насосом. Средняя подача из такой системы с четырьмя головками, работающими со смещением по фазе на 90° , иллюстрируется рис. 7.5.

Трубки Бурдона – это гибкие свернутые кольцом тонкостенные металлические трубки, запаянные с одного конца и заполненные жидкостью. Когда жидкость сдавливается, трубка стремится разогнуться, рассеивая часть энергии сжатой жидкости и перераспределяя ее в течение следующей части цикла работы насоса. Таким образом, если в систему насос–колонка включена трубка Бурдона, то перераспределение энергии может быть достаточным для того, чтобы достичь существенного демпфирования потока. В других системах такого типа для перераспределения энергии применяют, например, резиновые трубки или воздушные карманы.

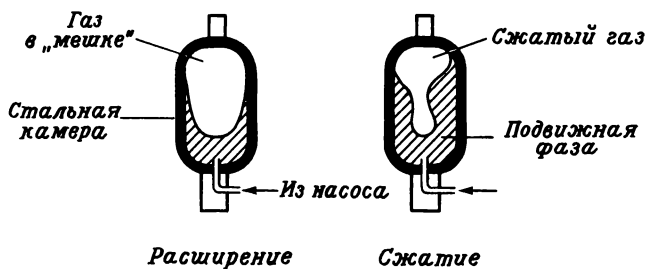
Содержащийся в воздушном кармане газ используют в поршневых демпферах для того, чтобы абсорбировать и перераспределить энергию насоса. Такой демпфер показан схематически на рис. 7.6. Когда насос вытесняет жидкость, воздух сжимается и часть вытесняемой жидкости поступает в цилиндр. Когда подача насоса падает до нуля, воздух расширяется, вытесняя жидкость в колонку. В результате в среднем скорость подачи остается постоянной. При высоких давлениях демпферы этого типа эффективны только при условии тщательного изготовления поршня и цилиндра.



Р и с. 7.5. Поток на выходе из насосов с несколькими головками.



Р и с. 7.6. Система с поршневым демпфером.



Р и с. 7.7. Гидродинамический аккумулятор.

Гидродинамические аккумуляторы по конструкции аналогичны описанным ранее системам с сжатым газом. Типичный гидродинамический аккумулятор (рис. 7.7) состоит из эластичного мешка в стальной оболочке. Мешок заполнен газом (обычно воздухом), а пространство между мешком и оболочкой – подвижной жидкой фазой, прокачиваемой через систему. Сжатие газа в мешке и его последующее расширение в течение цикла работы насоса обеспечивают необходимое сглаживание потока. Устройство этого типа, как утверждают, должно работать при давлениях вплоть до 400 атм, и их использование ограничено возможностью действия подвижной фазы на эластичный материал мешка. Это ограничивает число элюентов, которые могут быть использованы. Кроме того, добавки, вводимые в полимерные материалы, из которых изготавливают мешки, могут выщелачиваться растворителями, что может привести к загрязнению элюата. Однако в случае "мягких" растворителей эти устройства (стоимость их составляет ~50 долл.) вполне пригодны.

7.2.8. Обезгаживание растворителя

Растворенный воздух из подвижной фазы желательно удалить до того, как она поступит в колонку, по двум причинам: 1. В ячейке детектора могут образовываться пузырьки воздуха, что мешает его работе. Это особенно важно при использовании дифференциального рефрактометра, так как в нем обычно поддерживается температура немного выше, чем температура колонки. 2. В колонке может происходить окисление. Чтобы удалить воздух, обычно прежде, чем подвижная фаза поступит в насос, ее нагревают до температуры чуть ниже температуры кипения.

7.3. МАНОМЕТРЫ

Из всех вспомогательных устройств для жидкостной хроматографии манометры, вероятно, являются наименее обязательными. Они используются для того, чтобы показывать давление на входе в колонку, которое связано через проницаемость с важным параметром – линейной скоростью элюента. Помимо того, что давление характеризует проницаемость колонки (скорость элюента рассчитывать более удобно по данным об объеме потока и мертвом объеме колонки), его следует знать, чтобы следить за безопасностью работы. Однако автоматические выключатели, которые отключают насос, если давление превышает заданный уровень, с точки зрения техники безопасности лучше, так как они функционируют автоматически. В продаже имеется большое количество разнообразных манометров с пределами измерения от 0–10 до 0–2 000 атм. Их действие основано на принципе трубки Бурдона.

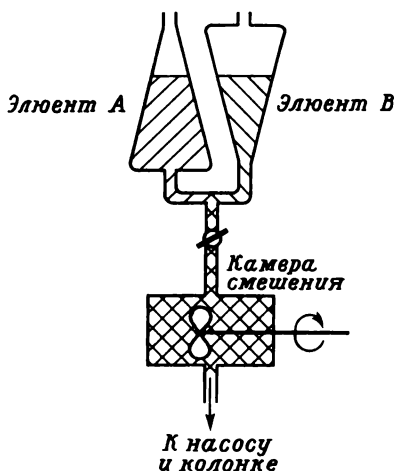
7.4. УСТРОЙСТВА ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ГРАДИЕНТНОГО ЭЛЮИРОВАНИЯ

Градиентное элюирование является наиболее ценным методом в жидкостной хроматографии. Этим термином называют процесс, предполагающий изменение состава элюента во времени. Элюирующая способность подвижной фазы при этом должна прогрессивно возрастать, так, чтобы из колонки за приемлемое время элюировались сильно удерживаемые разделяемые вещества. Градиентное элюирование можно рассматривать как аналог программирования температуры в газовой хроматографии. Изменение состава подвижной фазы обычно осуществляется непрерывно и более или менее линейно. Однако в определенных обстоятельствах может быть полезным резкое изменение состава элюента.

Для создания элюентов с непрерывно изменяющимся составом используются различные простые устройства, выпускаемые промышленностью, их также можно легко изготовить в лаборатории. На рис. 7.8 показано типичное устройство, изготовленное целиком из стекла.

Элюенты *A* и *B* не обязательно должны быть чистыми соединениями. Например, очень медленно возрастающую концентрацию, скажем, толуола в гептане можно создать, имея в качестве элюент *B* чистый гептан, а в качестве элюента *A* — гептан, содержащий несколько процентов толуола. В системах такого типа можно использовать большее число связанных вместе резервуаров для элюентов. При этом необходимые линейные градиенты получаются при довольно низких рабочих давлениях (примерно до 10 атм).

Снайдер и Сондерс [4] описали более сложное устройство для создания оптимизированной (логарифмической) программы растворителя при давлениях вплоть до 400 атм. В этой системе элюент загружается в серию "удерживающих" колонок, каждая из которых, чтобы свести к минимуму возможность перемешивания ее содержимого при последовательном переводе в разделяющую колонку, заполнена стеклянными шариками. Каждая удерживающая колонка заполняется выбранным элюентом, элюирующая способность которого последовательно возрастает, так что



Р и с. 7.8. Стеклянное устройство для создания линейных градиентов элюента.

создается непрерывный градиент. Поскольку элюенты смежных удерживающих колонок до некоторой степени смешиваются, действительные изменения в растворителе не являются столь резкими. Эта система имеет следующее преимущество: пользуясь ею, можно приготовить очень точные составы элюента, которые не слишком сильно изменяются при последующем смешивании. Кроме того, поскольку элюенты удерживаются в стальных колонках, хроматографирование можно проводить при очень высоких давлениях. Однако емкость системы ограничена (указанный Снайдером предел составляет 330 мл), а необходимость иметь большое число удерживающих колонок делает систему громоздкой. Этот метод, вероятно, целесообразно применять только в тех случаях, когда требуется создать довольно сложную программу элюента, предусматривающую использование смесей с большим числом (например, более пяти) чистых материалов, чтобы можно было провести особенно трудные разделения.

В других системах с удерживающими колонками выбранные элюенты удерживались отдельно за счет разности плотностей, так что заполненная колонка содержала дискретные слои растворителей с прогрессивно меняющейся элюирующей способностью /5/. Такой подход был использован при разделении методом адсорбционной хроматографии тяжелых фракций нефти на окиси алюминия.

В продаже имеется несколько генераторов переменного градиента. Обычно в них используются два насоса, которые могут быть запрограммированы в определенном интервале скоростей и режимов работы таким образом, что общий продукт смешения из двух насосов довольно хорошо следует разработанному градиенту рН, элюирующей силы, плотности и т.д. Эти устройства в настоящее время работают до давлений примерно 100 атм, но, безусловно, можно использовать вспомогательные насосы высокого давления и повысить давление до любого требуемого уровня.

Авторы полагают, что в настоящее время наиболее экономичная и удобная система, пригодная для получения почти всех сложных градиентов, предполагает использование смешивающих систем типа показанной на рис. 7.8 и насосов высокого давления (для подачи элюента в колонку).

7.5. УСТРОЙСТВА ДЛЯ ВВОДА ПРОБЫ

Образцы, предназначенные для разделения методом жидкостной хроматографии, вводят в жидком виде. В тех случаях, когда разделяемые соединения в обычном состоянии являются твердыми веществами, их вводят в виде растворов в подходящих растворителях. Как и в газовой хроматографии, пробу вводят шприцем или с помощью крана-дозатора.

Первый способ удобнее и дешевле и позволяет легко менять вводимый объем от долей микролитра и выше. Он имеет несколько важных ограничений, которые резко суживают возможности его использования в высокоэффективной жидкостной хроматографии. Дело в том, что при таком способе введения пробы обычно используют самозатягивающиеся полимерные перегородки, через которые проталкивают иглу шприца для того, чтобы можно было ввести образец в подвижную фазу. Такие перегородки при давлениях выше примерно 20 атм дают утечку; при таких давлениях перегородки могут быть вытолкнуты наружу через удерживающую гайку. Кроме того, содержащиеся в полимерах органические добавки (например, масла-наполнители и антиоксиданты), полимеры с низким молекулярным весом и непрореагировавшие мономеры могут выщелачиваться из прокладки подвижной фазой и загрязнять колонку, детектор и собираемые фракции. Эти недостатки частично можно компенсировать.

Описанная Харреллом и Амсом /7/ система введения пробы в газовый хроматограф высокого давления позволяет расширить допустимый диапазон давлений. Прокладка в этой системе удерживается гайкой, в которой имеется очень маленькое, достаточное только для введения иглы отверстие, что позволяет создать максимально твердую опору сжатой прокладке. Чтобы защитить прокладку от выщелачивания элюентом, ее можно обернуть в пленку политетрафторэтилена, как предлагает Скотт и др. /8/. При такой конструкции системы ввода можно использовать прокладки и вводить пробы с помощью шприца при давлениях вплоть до примерно 100 атм. Однако в этих условиях нельзя ожидать количественного перевода образца из шприца в колонку.

С помощью шприца образцы можно также вводить в колонки, используя разборное устройство для введения пробы. Прежде чем ввести пробу, поток подвижной фазы останавливают, открывают отверстие для ввода пробы и вводят образец. Приняв меры, чтобы в систему не попал воздух, отверстие закрывают и возобновляют поток элюента. Это медленный и отнюдь не изящный метод. Поскольку для восстановления установившегося режима в потоке требуется некоторое время, могут возникнуть трудности при идентификации посредством изменения удерживания, а также при оценке влияния изменений в скорости элюента на характеристики колонки. Тем не менее это практический метод, который, если это необходимо, можно применить в работе при чрезвычайно высоких давлениях.

Использование кранов-дозаторов дает возможность избежать некоторых из уже отмеченных трудностей, связанных с введением пробы с помощью шприца. На рис. 7.9 показан типичный жидкостной кран-дозатор скользящего типа, там же демонстрируется принцип его действия. Обычно используемые краны-дозаторы целиком выполнены

из политетрафторэтилена. Образец заполняет имеющееся в штоке крана отверстие, объем которого известен, после этого шток перемещается в положение, в котором образец вытесняется элюентом в колонку. Возможен пневматический привод таких кранов, что позволяет автоматизировать ввод образцов при серийном контроле продукта. Применяются также поворотные краны; их можно изготавливать из различных материалов, хотя обычно для этой цели используют нержавеющую сталь.

Хотя число разновидностей кранов-дозаторов быстро увеличивается и их выпускается достаточно много, у всех них наблюдаются

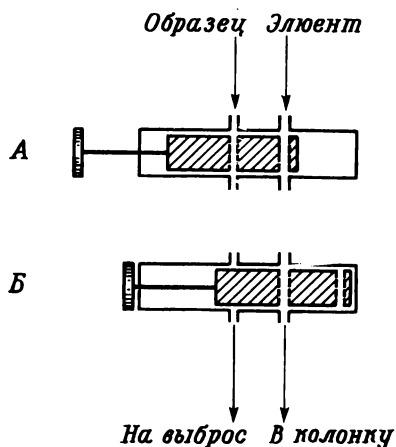


Рис. 7.9. Действие скользящего кран-дозатора.

Положение А: образец заряжает кран; положение Б: образец вымывается в колонку.

три недостатка, и краны станут широко использоваться только после того, как эти недостатки будут ликвидированы. Итак, краны-дозаторы имеют следующие недостатки: ограниченный диапазон объемов образца, которые могут быть введены с помощью любого одного крана, ограниченная максимальная температура и ограниченное максимальное давление, при котором кран может работать. Рассмотрим их по порядку. Вполне понятно, что ограниченный объем образца является не более чем умеренно дорогим неудобством. Неудобством потому, что для изменения величины пробы, петлю или полость (в которую попадает образец и затем переносится в поток подвижной фазы), следует в лучшем случае поменять, так как каждая петля или полость неизбежно имеют фиксированный объем. Дорогим неудобством потому, что чтобы охватить диапазон требуемых объемов образца, иногда необходимо купить несколько различных кранов. Это делает краны неудобными по сравнению со шприцами. Максимальная рабочая температура для большинства кранов колеблется в пределах 150–200°C; предельная температура определяется деформацией движущихся частей, сплав или даже разложением полимерных деталей крана при более высоких температурах. Это может ограничивать возможности применения кранов при разделении методом жидкостной хроматографии очень плохо растворимых материалов (имеющих достаточную растворимость в идеальном для хроматографии растворителе только при температурах выше 200°C) или очень вязких жидкостей.

три недостатка, и краны станут широко использоваться только после того, как эти недостатки будут ликвидированы. Итак, краны-дозаторы имеют следующие недостатки: ограниченный диапазон объемов образца, которые могут быть введены с помощью любого одного крана, ограниченная максимальная температура и ограниченное максимальное давление, при котором кран может работать. Рассмотрим их по порядку. Вполне понятно, что ограниченный объем образца является не более чем умеренно дорогим неудобством. Неудобством потому, что для изменения величины пробы, петлю или полость (в которую попадает образец и затем переносится в поток подвижной фазы), следует в лучшем случае поменять, так как каждая петля или полость

Несомненно, наиболее серьезным недостатком кранов-дозаторов является ограниченность рабочих давлений. В настоящее время выпускаются краны, которые можно использовать при давлениях вплоть до 200 атм. Если для продавливания жидкости со скоростью $1 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ через колонку длиной 1 м с внутренним диаметром 4 мм, заполненную неподвижной фазой со средним диаметром частиц примерно 40 мкм, давление должно составлять около 10 атм, то давления 200 атм более, чем достаточно для работы на чрезвычайно длинных колонках при скоростях потока значительно более высоких, чем оптимальная скорость, необходимая для максимального разрешения. Иными словами, ограничения по давлению лучших образцов кранов-дозаторов в настоящее время не так важны, как это может показаться. Однако следует иметь в виду, что: а) большинство кранов-дозаторов не могут работать при давлениях выше 50–100 атм и б) весьма вероятно, что в будущем неподвижные фазы с частицами диаметром 1–10 мкм окажутся более подходящими. Проницаемость колонок, заполненных очень мелкими частицами, намного меньше проницаемости колонок, приведенной выше в качестве примера. (Уменьшение на порядок среднего диаметра частиц требует соответствующего увеличения давления, поэтому для частиц диаметром 4 мкм давление на входе 200 атм было бы достаточным только для колонок длиной примерно до 5 м.)

Таким образом, устройства для ввода проб – шприцы и краны – по-видимому, соответствуют современному состоянию хроматографии в колонках. Единственно удобный и практичный способ введения пробы при очень высоких давлениях предусматривает использование кранов. Устройства для ввода пробы непрерывно совершенствуются и выпускаются все новыми и новыми фирмами.

7.6. КОЛОНКИ И АРМАТУРА

Неэффективная "старомодная" хроматография в колонке почти неизменно включала использование стеклянных колонок. Но поскольку в "новой" хроматографии давления обычно превышают 10 атм, стекло имеет ограниченное применение. Максимальное рабочее давление даже для толстостенных стеклянных трубок равно примерно 100 атм. Для пластмассовых колонок оно еще ниже, так что для практических целей можно использовать только толстостенные стеклянные или металлические колонки. Как и в газовой хроматографии, выбирать, очевидно, надо между нержавеющей сталью, медью и алюминием.

Длина и диаметр колонок влияют на достижимую степень разрешения и проницаемость. В то же время размеры колонок определяют и методы заполнения. Например, набивая колонки очень маленького диаметра (с внутренним диаметром 2 мм), трудно достичь хорошего уплотнения слоя. Очень длинные колонки, как правило, удобнее согнуть

или свернуть кольцом. Обычно это следует сделать до операции заполнения колонки, так как такого рода манипуляции с заполненной колонкой могут серьезно снизить ее эффективность. Исследованию методов заполнения посвящено очень мало работ, и, по-видимому, до сих пор лучшими являются методы, включающие уплотнение адсорбента посредством утрамбовывания /9-11/*. Эта операция может быть выполнена только в прямых колонках длиной не более одного или максимально двух метров. Если бы можно было разработать простые методы заполнения колонок, дающие ВЭТТ меньше 1 мм после свертывания заполненной колонки или после заполнения пустых свернутых в кольцо колонок, то можно было бы использовать довольно длинные, легче изготавливаемые медные трубки при условии, что образцы, подлежащие разделению, не реагируют с металлом.

Для заполнения прямых металлических колонок длиной 1 м предлагается следующая методика:

1. Закрепить соединительное звено на нижнем конце колонки, используя это соединение как опору для пористой заглушки, которая будет удерживать шихту колонки (подходящими являются фильтры с малыми порами типа "Millipore" или "Gelman").

2. Насыпать в колонку такое количество достаточно сухой шихты, чтобы она заняла примерно 2 см длины перед уплотнением.

3. Поместить на уплотняемый слой металлический шток или шток с тефлоновым наконечником. Шток должен быть плотно пригнан к колонке и вместе с тем должен достаточно свободно в ней двигаться.

4. Утрамбовать слой набивки, осторожно постукивая нижней частью колонки об пол, так, чтобы шток или "трамбовочный" прутوك спрессовал слой неподвижной фазы.

5. Несколько раз осторожно постучать по стенкам колонки, чтобы слой лучше уплотнился.

6. После того как будет завершено уплотнение первой порции шихты, т.е. не будет наблюдаться никакого дальнейшего спрессовывания, добавляют еще 2 см шихты и повторяют операцию до тех пор пока колонка не будет заполнена полностью.

После приобретения некоторого опыта заполнение колонки длиной 1 м занимает около 15 мин. Таким способом рекомендуется производить упаковку шихты с размером частиц выше примерно 20 мкм. Эта методика не пригодна для упаковки более тонких материалов, для которых пока еще нет единого метода, который можно было бы с уверенностью рекомендовать.

Необходимой арматурой колонки является устройство для ввода образца, если только не используют кран-дозатор, а также межколо-

* Заполнение колонок очень мелкими частицами (<5 мкм) проводят суспензионным методом. - Прим. перев.

ночные, доколоночные и послеколоночные соединения. Критическими факторами являются мертвые объемы всех тех деталей, через которые проходят образцы; во всех случаях эти объемы должны быть минимальными. Длина соединительных линий всегда должна быть по возможности наименьшей, но оптимальный диаметр может и не быть минимальным потому, что в случае очень маленьких диаметров из-за большой скорости потока течение может становиться турбулентным. Следствием этого была бы некоторая потеря разрешения. Таким образом, необходимо найти экспериментально оптимальный диаметр как функцию скорости потока. Удачная конструкция соединительного узла колонок описана в работе /9/; там же описан тщательно сконструированный узел ввода образца, позволяющий свести до минимума размывание полосы. По существу этот узел состоит из аксиально закрепленной узкой направляющей, по которой игла шприца вводится в верхнюю часть слоя стеклянных шариков маленького диаметра (примерно 50 мкм). Слой стеклянных шариков длиной ~8-10 см служит для того, чтобы распределить введенный образец более равномерно по всему поперечному сечению прежде, чем проба достигнет разделяющего слоя шихты.

Не все исследователи используют зону стеклянных шариков в верхней части колонки; некоторые из них считают, что при вводе пробы с помощью шприца может легко засориться игла. Хотя авторы работ /8, 9/ нашли, что слой стеклянных шариков уменьшает размывание, Хьюбер полагает, что диффузия, неизбежная в слое, вызывает размывание полос разделяемых веществ, и предпочитает вводить пробу в короткий (~5 мм) слой тефлона или стекловолокна.

Колонки обычно работают при комнатной температуре. Однако имеется несколько веских причин, по которым температуру колонки следует контролировать и в случае необходимости менять.

- а. Растворимость разделяемых веществ может быть недостаточной при низких температурах.
- б. Подвижные фазы могут быть слишком вязкими при комнатной температуре, и соответственно при прокачивании требуются более высокие давления.
- в. Температура влияет на относительное удерживание, поэтому данное разделение может быть выполнено легче при изменении температуры.
- г. В распределительной жидкостной хроматографии требуется точный температурный контроль для того, чтобы поддерживать фиксированное двухфазное равновесие и избежать "истечения" колонки.
- д. С ростом температуры уменьшается вязкость подвижной фазы, а это уменьшает размывание пика.

В настоящее время ряд фирм выпускает жидкостные хроматографы, и вскоре, очевидно, как и в газовых хроматографах, колонки жидкост-

ных хроматографов будут помещаться в термостаты. Как и в газовой хроматографии, для использования прецизионных данных по удер- живанию для решения трудных проблем идентификации, а также для обеспечения стабильности более чувствительных к температуре сис- тем с распределением будет необходим очень точный контроль тем- пературы, $\pm 0,1^\circ$ и выше. Для этих целей, вполне вероятно, могут быть использованы жидкостные термостаты. Было высказано пред- положение о возможности программирования температуры жидкост- ных колонок /12/, но некоторые авторы предпочитают градиентное элюирование как намного более эффективное средство для достиже- ния такого же результата /13/.

7.7. МЕЛЬНИЦЫ И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

В настоящее время мы располагаем достаточными теоретичес- кими /14/ и экспериментальными /9, 15, 16/ доказательствами того, что очень маленькие частички одинакового (т.е. в узких пре- делах) диаметра обеспечивают предельное качество колонки. Сейчас такие материалы уже выпускаются промышленностью. Однако, если взять наиболее часто используемый адсорбент, силикагель, то мы увидим, что большинство поставщиков предлагают все-таки только сравнительно широкую фракцию крупных частиц, диаметром обычно больше 75 мкм. Выпускается также силикагель для хроматографии в тонком слое; это обычно частицы размером от 5 до 50 мкм. Что- бы получить интересующую нас более узкую фракцию частиц малень- кого диаметра (т.е. 5-10, 20-30 мкм и т.д.), хроматографист должен иметь возможность измельчить крупные гели и отсеять или каким-либо иным путем отделить основной гель или выделить тре- буемую фракцию. Таким образом, в настоящее время (хотя в буду- щем, мы надеемся, необходимость в этом отпадет) хроматографист, занимающийся жидкостной хроматографией, должен иметь оборудова- ние для размолта и фракционирования.

Можно, конечно, размолоть материал вручную, используя ступ- ку и пестик, но эта операция поглощает так много времени, что го- раздо целесообразнее пользоваться механическими мельницами, хотя они стоят довольно дорого.

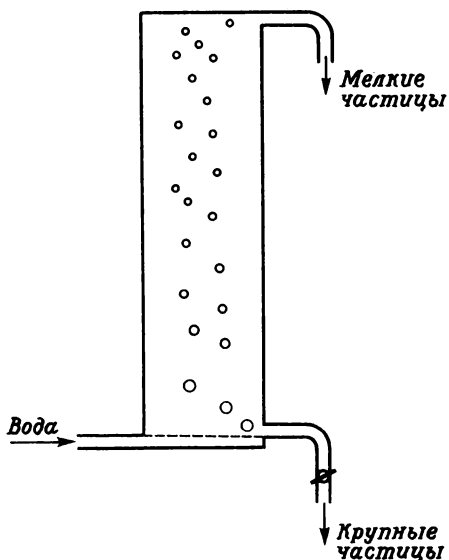
Существует два стандартных лабораторных метода препаративно- го фракционирования: ситовой и седиментационный. Для фракциони- рования применяются сита двух основных типов: проволочные сетки и электротравленные металлы. На них просеивают сухой материал или, чтобы облегчить операцию, просеивание проводят под действием то- ка жидкости (обычно воды) или воздуха. Сита из проволочных се- ток широко используются, но, за редким исключением, они непригод- ны для фракционирования частиц диаметром меньше 50 мкм. Мини- мальный размер отверстия у таких сит примерно равен 25 мкм. Крп-

ме того, у проволочных сит можно нарушить плетение, в результате чего некоторые отверстия могут стать существенно больше или меньше их номинального размера.

На электротравленных никелевых ситах размер ячеек достигает 5 мкм. По существу это металлические мембраны, в которых вытравлены отверстия соответствующего размера. Следовательно, размеры ячеек этих сит могут измениться только при неправильном употреблении. К сожалению, общая площадь отверстий такого сита намного меньше, чем у проволочного, а, следовательно, производительность намного ниже, хотя все другие характеристики отличные.

При просеивании сухих материалов трущиеся друг об друга частицы электризуются и образуют непроеиваемые агломераты. Если через набор используемых сит пропустить постоянный поток воды, этот эффект исключается и фракционирование будет более полным и быстрым. Ситовое фракционирование — процесс очень медленный и разделение по фракциям больших количеств материалов, по-видимому, гораздо целесообразнее проводить методом седиментации.

В типичном серийном седиментационном фракционировании образец с широким распределением по размерам добавляется в жидкость, обычно воду, содержащуюся в вертикальной колонке (рис. 7.10). Поднимающийся поток воды уносит из колонки мелкие частицы, тогда как самые тяжелые частицы оседают на дно и периодически извлекаются. Диапазон размеров частиц, остающихся в суспензии, в принципе контролируется скоростью потока воды. Поэтому методом подбора находят и устанавливают скорость, необходимую для получения фракций с требуемым распределением частиц по размерам.



Р и с. 7.10. Седиментация носителей и адсорбентов.

7.8. КОЛЛЕКТОРЫ

В течение многих лет хроматография в колонках использовалась как процесс разделения с целью получения подлежащих дальнейшему

исследованию материалов, а не как единый аналитический процесс. Поэтому процесс сбора фракций элюата автоматизирован. В настоящее время в продаже имеются коллекторы различной формы, пригодные для получения очень маленьких (1 мл) или очень больших (100 мл) фракций, которые могут, например, охлаждаться. Коллекторы могут быть снабжены счетчиками капель, таймерами и другими датчиками, позволяющими контролировать сбор требуемых порций элюата. Оборудование такого типа продают очень многие компании, перечень поставщиков этих приборов приведен в работах /1, 2/.

Вновь развивающаяся высокоэффективная хроматография, будучи в основном аналитическим методом, может быть полезной также для получения небольших образцов, предназначенных для дальнейшего исследования. Поэтому можно предположить (хотя, насколько нам известно, в настоящее время такие устройства еще не разработаны), что скоро появятся коллекторы фракций, размеры которых будут намного меньше, чем у существующих моделей. Они будут разработаны специально для сбора фракций объемом 0,01–1,0 мл, и вместо счетчика капель или таймера ими будет управлять выходной сигнал детектора. Эти устройства будут похожи на системы сбора фракций, разработанные для препаративных газовых хроматографов, только в них не нужно будет вымораживать легкие фракции.

7.9. ДЕТЕКТОРЫ

7.9.1. Введение

Хотя возрождающийся интерес к жидкостной хроматографии в колонках вызван запоздалым пониманием того, что методы, техника и принципы, успешно используемые в газовой хроматографии, применимы и к жидкофазным разделениям, следует все же отметить, что единственным решающим фактором, обусловившим развитие жидкостной хроматографии, было введение детекторов, позволяющих вести непрерывный контроль элюата. Никакие усовершенствования колонок и методик заполнения не могут компенсировать утомительность сбора фракций и их исследования, которые при отсутствии детекторов были бы единственными способами контроля разделения в колонке. Наглядная картина улучшения разделения, получаемая на ленте самописца, дала возможность сосредоточить усилия на усовершенствовании конструкций колонок и проверке потенциальных возможностей их применения. Поэтому мы считаем необходимым подробно описать системы детектирования. В настоящее время в жидкостной хроматографии отсутствует реальный эквивалент катарометру или пламенно-ионизационному детектору, применимым в ГХ.

Поиску такого детектора посвящено много исследований. При описании принципов работы наиболее удачных детекторов мы будем об-

решать внимание на степень их совершенства, достигнутую к настоящему времени, и на потенциальные возможности их дальнейшего развития.

В табл. 7.2 перечислены свойства, которыми должен обладать идеальный детектор. В настоящее время ни один из существующих детекторов даже отдаленно не отвечает идеалу, и маловероятно, чтобы вообще какой-либо один тип детектора мог обладать всеми указанными свойствами.

Свойства идеального детектора

Таблица 7.2

Откликается на все растворенные вещества или даже имеет предсказываемую чувствительность
Не откликается на подвижную фазу
Имеет высокий и предсказываемый отклик
Не откликается на изменения окружающей температуры и скорости потока элюента
Не вызывает размывания полосы растворенного вещества
Дает информацию, позволяющую идентифицировать детектируемое растворенное вещество
Прост в использовании и дешев
Дает отклик, интенсивность которого возрастает пропорционально количеству растворенного вещества
Не разлагает растворенного вещества

Не нужно особо пояснять, почему желательно, чтобы используемый детектор давал отклик на все разделяемые растворенные вещества. В общем необходимо получить полную картину достигаемого разделения и при отсутствии универсального чувствительного устройства необходимо иметь серию менее универсальных детекторов, которые вместе давали бы полный профиль элюирования. Такие системы, помимо того, что они усложняют установку, должны быть чрезвычайно дороги.

В жидкостной хроматографии, так же как и в газовой, специфические детекторы должны играть определенную роль. Однако следует отметить, что в первое десятилетие интенсивного развития ГХ в хроматографических системах использовались почти исключительно универсальные по чувствительности детекторы. Только теперь, примерно 20 лет спустя после рождения газожидкостной хроматографии, специфические детекторы начинают играть заметную роль в обычной ГХ. Следовательно, можно сделать вывод, что в жидкостной хроматографии должен быть детектор, подобный катарометру или газовым весам.

Главная причина, по которой в идеале детектор в ЖХ не должен откликаться на подвижную фазу, следует из того факта, что в элю-

ентной хроматографии концентрация растворенного вещества в растворе, вытекающем из колонки, редко превышает 1%, а часто на несколько порядков меньше. Наличие отклика на чрезвычайно большой избыток элюента требует, чтобы состав и скорость последнего оставались постоянными, иначе "шумы", вызываемые изменением этих факторов, могут совершенно заглушить любой отклик, обусловленный присутствием элюируемого вещества. Для многих разделений желательно применять градиентное элюирование. В этом случае изменение состава подвижной фазы, если детектор откликается на эти изменения, может вызвать серьезные трудности. Два первых качества идеального детектора являются в значительной степени несовместимыми, хотя фактически имеется по меньшей мере одна система, почти не дающая отклика на подвижную фазу, и существуют способы, позволяющие преодолеть проблему отклика на элюент.

Необходимость иметь высокий и заранее известный отклик обусловлена тем, что в будущем ЖХ в колонках должна будет обеспечить высокое разрешение и точный количественный анализ сложных образцов. Известно, что с уменьшением размера образца улучшается разрешение разделяемых компонентов. В высокоэффективной ЖХ используются образцы размером от 10^{-2} до 10^{-6} г, причем содержание индивидуальных компонентов составляет 1% этого количества. Поэтому нужна система, которая будет детектировать 10^{-8} г (желательно меньше) вещества, элюируемого примерно в 1 мл элюента, при этом максимальная концентрация разделяемого вещества в пике находится на уровне $10^{-4}\%$. Следует подчеркнуть, что чувствительность системы должна быть высокой, однако в настоящее время чувствительность большинства детекторов все еще недостаточна. Возможность связывать величину отклика с молекулярной структурой детектируемого вещества не является обязательной. Обычно, используя данные, полученные для чистых компонентов, можно приготовить калибровочные кривые. Однако наличие такой зависимости имеет большое значение как при определении компонента, который нельзя получить для калибровки, так и при определении типа соединения на основании величин откликов двух детекторов.

Абсолютное постоянство потока и температуры фактически недостижимо, и чем менее детектор чувствителен к изменениям этих факторов, тем легче и дешевле его использовать. Например, демпфировать создаваемые насосами пульсации в потоке подвижной фазы довольно сложно; аналогично, если температура существенно влияет на величины каких-либо физических свойств (которые при других обстоятельствах являются идеальными индикаторами присутствия растворенных веществ в элюенте), требуются термостатирующие устройства, которые при недостаточно хорошей конструкции могут внести значительный вклад в размывание полосы в линиях, соединяющих колонку с детектором.

Если необходимо высокое разрешение, понятно, что любое дополнительное размывание полосы разделяемого вещества должно быть исключено. Если внеколоночные факторы обуславливают размывание пика в несколько раз больше, чем сама колонка, нет смысла тщательно готовить колонку и оптимизировать параметры ее работы.

В табл. 7.2 мы отметили, что идеальный детектор должен давать качественную информацию о детектируемых веществах. Жидкостную хроматографию обычно применяют к малолетучим и обычно сложным молекулам. В результате идентификация веществ на основании измерений величин удерживания в ЖХ – задача трудная, требующая времени. Поэтому любая информация, полученная от детектора, например указание о том, что присутствуют специфические функциональные группы или элементы, является полезной. Когда идентификация затруднена, необходимо собирать фракции для последующего спектроскопического и химического анализа; в этих случаях исследуемое вещество не должно разлагаться в детекторе.

Таблица 7.3

Детекторы для высокоразрешающей жидкостной хроматографии

Выпускаются промышленностью, подробно описаны в литературе детекторы следующих типов:

- по показателю преломления
- по теплоте адсорбции
- спектрофотометрические
- транспортно-ионизационные
- по радиоактивности
- по электропроводности

В основном изготовлены собственными силами, рассматриваются в немногих опубликованных работах детекторы следующих типов:

- полярографические
 - по теплоте реакции
 - по плотности
 - по диэлектрической проницаемости
 - по давлению паров
-

В количественном хроматографическом анализе линейное соотношение между количеством растворенного вещества и сигналом детектора упрощает калибровку. Обычно диапазон концентраций вещества, в котором сигнал является линейным, отличается у различных детекторов; при прочих равных условиях предпочтителен детектор с большим линейным диапазоном.

Желательными свойствами детектора являются простота использования и дешевизна. В анализе надо руководствоваться следующим правилом: для получения необходимой информации следует использо-

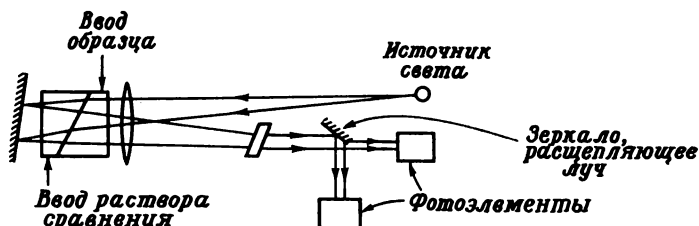
вать те методы и приемы, которые наиболее дешевы, просты и удобны. Жидкостная хроматография не является исключением, а чрезвычайная популярность хроматографии в тонком слое (в отличие от колоночной) свидетельствует о широко распространенном признании этого "правила".

Далее мы обсудим детектирующие системы, которые уже сейчас стали или могут стать полезными для контроля высокоскоростного, высокоэффективного хроматографического разделения в колонке. В табл. 7.3 приведены основные типы детекторов и указано, как широко каждый из них в настоящее время используется.

7.9.2. Детектирующие системы, выпускаемые промышленностью

а. Рефрактометрические детекторы

Одним из первых появившихся в продаже детекторов с достаточной чувствительностью и универсальностью отклика был дифференциальный рефрактометр "Waters R 4"; он служил мозгом "современного" жидкостного хроматографа "Waters Gel Permeation Chromatograph". Поэтому рефрактометрия сыграла особую роль в развитии хроматографии в колонках. После того как конструкция "Waters R4" была усовершенствована, другие компании стали производить рефрактометры, пригодные для использования в качестве детекторов. В настоящее время рефрактометрические детекторы используются, вероятно, шире, чем любой другой тип детектора; по существу они обеспечивают непрерывную запись изменений показателя преломления элюата на выходе из колонки.



Р и с. 7.11. Схема детектора по показателю преломления.

На рис. 7.11 схематически показан типичный дифференциальный рефрактометр. Свет проходит через ячейку для образца и ячейку сравнения и отражается через них назад на расщепляющее луч зеркало, расположенное таким образом, что когда жидкости в двух ячейках

имеют один и тот же показатель преломления, интенсивность лучей одинакова. При изменении показателя преломления жидкости положение падающего на зеркало светового луча меняется, и интенсивности расщепленных лучей в этом случае отличаются. Дифференциальный сигнал на выходе фотоэлементов, следящих за интенсивностью лучей, воспроизводится на ленточном самописце. Записываемые пики могут быть как положительными, так и отрицательными в зависимости от показателя преломления веществ, элюируемых в подвижной фазе, а величина пика зависит от количества растворенного вещества и от разности между показателем преломления вещества и элюента.

Рефрактометрический детектор имеет ряд достоинств. Вероятно, наиболее важным является универсальность отклика. Почти всегда растворенное вещество и элюент имеют разные показатели преломления (разность Δn_D), поэтому с помощью рефрактометра можно практически детектировать любое вещество. Предел детектирования определяется разностью Δn_D и количеством растворенного вещества. Используя стандартные дифференциальные рефрактометры, можно детектировать вещества, для которых Δn_D равна 10^{-7} ед. Если, например, показатели преломления растворенного вещества и подвижной фазы отличаются на 0,1 ед., то вещество можно практически детектировать при концентрации 1 мкг.мл^{-1} . Чувствительность можно повысить, если выбрать элюент с очень высоким или очень низким n_D . Так, в ситовой хроматографии, где состав подвижной фазы играет относительно небольшую роль по сравнению с характеристиками пористости неподвижной фазы, легко подобрать подвижную фазу с подходящим значением n_D . В адсорбционной и распределительной хроматографии, наоборот, важную роль играет состав подвижной фазы, и поэтому выбор элюентов ограничен. В табл. 7.4 приведены показатели преломления органических жидкостей, обычно используемых в жидкостной хроматографии (см. также табл. 3.4). Следует заметить, что среди веществ с очень высоким и очень низким n_D можно найти как сильно полярные, так и слабо полярные элюенты. Поэтому имеется некоторая возможность увеличить чувствительность детектирования и использовать соответствующую программу элюирования.

Рефрактометры не разрушают образца и при встречающихся на практике малых концентрациях растворенного вещества их сигнал линейно возрастает с количеством растворенного вещества.

Тем не менее рефрактометрические детекторы имеют ряд существенных недостатков, хотя их не следует преувеличивать. Несмотря на присущую этим устройствам высокую чувствительность к изменению n_D , их способность детектировать небольшие количества веществ редко бывает достаточной для работы с высоким разрешением. Кроме того, при работе с рефрактометром требуется очень тщательное гермостатирование. Температурный коэффициент n_D для большинства

органических веществ составляет $\sim 10^{-4}$ ед./ 1°C , поэтому, чтобы достигнуть потенциальной чувствительности рефрактометров, термостатирование следует проводить с точностью до $\pm 0,001^\circ\text{C}$. Поскольку температура детектора отражает изменения температуры окружающей среды, то она меняется медленно по сравнению со скоростью элюирования пиков. По-видимому, можно ожидать, что в будущем в дифференциальных рефрактометрах будет разработана электронная

Таблица 7.4.

Показатели преломления обычно используемых подвижных фаз

Подвижная фаза	n_D	Подвижная фаза	n_D
Метанол	1,33	Диэтиленгликоль	1,45
Метилформиат	1,34	Хлороформ	1,45
Ацетонитрил	1,34	Циклогексанон	1,45
Диэтиловый эфир	1,35	Четыреххлористый	
n-Пентан	1,36	углерод	1,46
Ацетон	1,36	Циклогексанол	1,46
Этанол	1,36	Трихлорэтилен	1,48
Метилацетат	1,36	Толуол	1,50
Этилацетат	1,37	Бензол	1,50
n-Гексан	1,38	Этилбензоат	1,51
Изопропанол	1,38	Пиридин	1,51
Нитрометан	1,38	Анизол	1,52
n-Гептан	1,39	Хлорбензол	1,53
n-Бутиламин	1,40	Фурфурол	1,53
Тетрагидрофуран	1,41	o-Дихлорбензол	1,55
Фуран	1,42	Нитробензол	1,55
Диоксан	1,42	Сероуглерод	1,63
Дихлорметан	1,43		
Циклогексан	1,43		
Диметилформамид	1,43		

компенсация температурного дрейфа, и, следовательно, трудности, обусловленные сложностью термостатирования, будут со временем преодолены.

Термостатировать необходимо не только ячейку рефрактометра, но и попадающие в нее жидкости; в некоторых промышленных приборах потоки жидкости, чтобы температура их стала постоянной, пропускают через довольно длинные трубки внутри термостатируемого металлического блока, хотя это неизбежно вызывает размывание пика. В высокоразрешающей хроматографии (т.е. в случае использования колонок с ВЭТТ $\sim 0,5$ мм) это, как было показано в работах /17, 18/, серьезно ограничивает общую характеристику системы.

Поэтому исследователи обычно изменяют систему подвода элюата в детектор, чтобы по возможности исключить трубки, и используют другие приемы для контроля условий окружающей среды и лучшего термостатирования.

Поддерживать постоянное значение показателя преломления элюента довольно сложно, поэтому использовать методы градиентного элюирования при детектировании с помощью дифференциального рефрактометра очень сложно. Бомба и сотр. /19/ предложили использовать для градиентного элюирования такие смеси растворителей, компоненты которых имеют приблизительно одинаковые показатели преломления (табл. 7.5); в настоящее время такой подход является наилучшим.

Таблица 7.5

Пары растворителей для градиентного элюирования
с использованием дифференциального рефрактометра

Неполярный компонент	n_D	Полярный компонент	n_D
<i>n</i> -Гептан	1,3855	<i>n</i> -Пропанол	1,3854
<i>n</i> -Гексан	1,3754	Изопропанол	1,3776
<i>n</i> -Пропиловый эфир	1,3807	Метилэтилкетон	1,3807

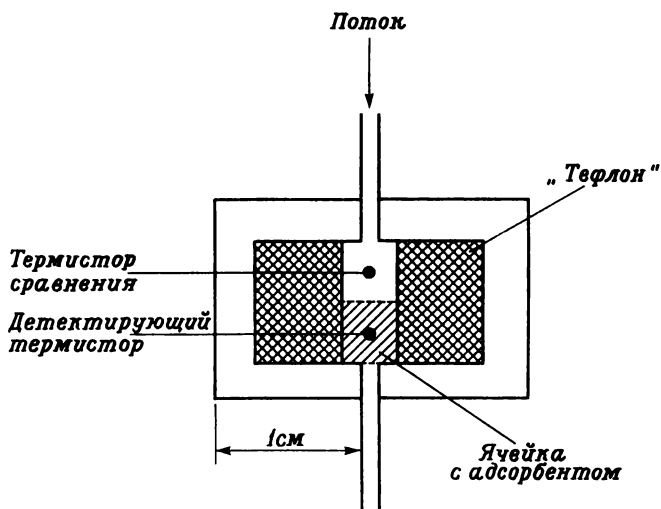
В целом дифференциальные рефрактометры являются хорошими детекторами общего назначения с умеренной чувствительностью. В данное время они лучше всего соответствуют требованиям, предъявляемым к универсальному детектору для ЖХ, но в будущем их неизбежно заменят более чувствительные и гибкие системы.

6. Детекторы по теплоте адсорбции

Основным элементом этих детекторов является чувствительный датчик температуры (обычно шарик термистора), погруженный в материал, на котором или в котором адсорбируются элюируемые вещества. Сорбция сопровождается выделением тепла и, следовательно, повышением температуры, измеряемой с помощью термистора. Поскольку хроматографический процесс зависит от взаимодействия растворенных веществ с удерживающей средой, то очевидно, что, если термистор помещается в тот же материал, который содержится в колонке, все разделяемые вещества (в отличие от тех, которые не удерживаются колонкой) будут в принципе детектироваться. Известно, что величина времени удерживания зависит от степени взаимодействия растворенного вещества с неподвижной фазой, поэтому компоненты, элюируемые позднее и с соответственно более широкими пиками, будут иметь более высокий отклик в расчете на моль вещества и будут детектироваться так же легко, как более ранние и более

острые пики. Детекторы этого типа можно рассматривать по-этому как "универсальные".

Типичное устройство ячейки показано на рис. 7.12. Элюент, содержащий растворенные вещества, покидает колонку и протекает сначала через сравнительную ячейку, содержащую только термистор; непосредственно за этой ячейкой расположена чувствительная часть детектора, представляющая собой аналогичную ячейку, содержащую адсорбент. Термисторы включены в два плеча моста Уитстона, и при протекании элюента изменения в температуре ячейки или элюента в основном самокомпенсируются. С помощью детектора по теплоте адсорбции могут быть детектированы изменения температуры порядка 10^{-4}°C . Для различных адсорбентов и типов растворенных веществ уровень чувствительности этого детектора различен, но, согласно литературным данным, можно достичь детектирования микрограммовых количеств растворенных веществ.



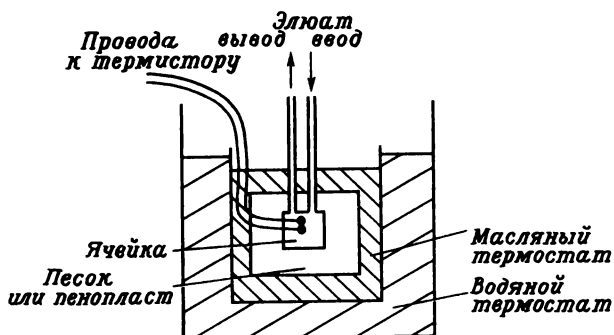
Р и с. 7.12. Детектор по теплоте адсорбции.

Рассмотрим вопросы, связанные с необходимостью термостатирования такого чувствительного к температуре устройства и с влиянием на выходной сигнал неизбежной эндотермической десорбции, всегда следующей за адсорбцией растворенного вещества.

Для успешной работы таких детекторов совершенно необходимо тщательное термостатирование окружающей среды или электронная компенсация дрейфа. Обычно ячейка помещается в хорошо изолированный, термостатированный или даже дважды термостатированный контейнер (рис. 7.13).

Необходимость тщательного термостатирования обуславливает также требование постоянства скорости потока. Только в этом случае удастся свести к минимуму кратковременную нестабильность. Описанные выше системы демпфирования обеспечивают достаточное сглаживание пульсаций на выходе из насосов высокого давления.

Адсорбционно-десорбционный цикл и отвод тепла из ячейки потоком подвижной фазы приводят к появлению пиков необычного вида. Рис. 7.14 поясняет, как образуются пики такой формы. На

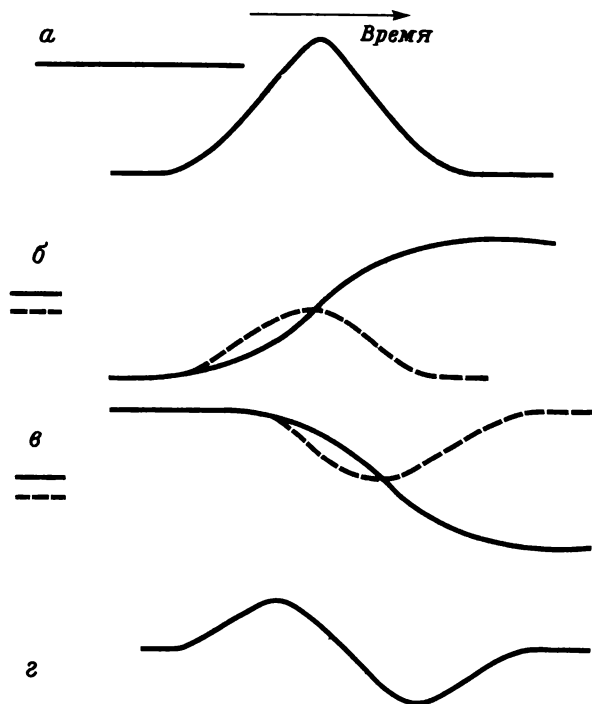


Р и с. 7.13. Изоляция детектора по теплоте адсорбции.

рис. 7.14, а показан профиль концентраций как функция времени; ниже рассматривается только адсорбция растворенного вещества и ее влияние на температуру ячейки; в адиабатической ячейке температура поднималась бы до более высокого постоянного уровня, но поскольку непрерывный поток элюента уносит тепло из ячейки, ее температура падает до первоначального уровня. Аналогичны изменения, связанные с десорбцией (рис. 7.14, б), но они имеют другой знак. Из-за последовательного протекания адсорбции и десорбции между этими процессами имеется запаздывание по времени, и показанный на рис. 7.14, в окончательный сигнал детектора представляет алгебраическую сумму температурных профилей, изображенных штриховыми линиями на рис. 7.14, б и в. На рис. 7.15 показана хроматограмма, полученная с помощью детектора по теплоте адсорбции (рисунк взят из публикации японской электронно-оптической лаборатории "JEOL").

Хотя эта хроматограмма имеет непревзойденный вид, ее интерпретация не сложна. Однако, если элюируются плохо разделенные пики, их необычная форма может затруднить интерпретацию. В результате исследователи неохотно пользуются детектором этого типа и пытаются обычно модифицировать его таким образом, чтобы пики имели при-

вычную форму гауссовой кривой. Сматс и сотр. /20/ решили изменить детектор таким образом, чтобы он был по существу адиабатическим. Им удалось это сделать, используя непрерывную подачу адсорбента в ячейку детектора; там адсорбент смешивался с элюентом и растворенными веществами и проходил над датчиком. Таким образом, условия вблизи датчика были фактически адиабатическими, поскольку движения элюента относительно адсорбента не происходи-

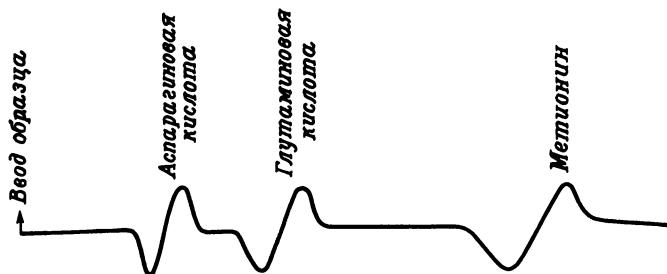


Р и с. 7.14. Выходной сигнал детектора по теплоте адсорбции.
 а — концентрация образца; б — температура адсорбции; в — температура десорбции; г — суммарный сигнал на выходе из реальной ячейки;
 ————— адиабатический режим; - - - - с потоком элюента.

ло; полученные пики имели обычную форму. Такой детектор найдет широкое применение, если удастся решить конструктивные проблемы и реализовать принцип его действия в достаточно уменьшенных промышленных системах.

Другим недостатком детекторов по теплоте адсорбции является то, что при использовании метода градиентного элюирования из-за адсорбции некоторых компонентов градиентных элюентов неизбежно возникает дрейф нулевой линии.

В настоящее время детекторы по теплоте адсорбции не вызывают особенного интереса из-за необычной формы получаемых пиков и трудностей термостатирования. Однако благодаря их универсальности и возможности использования в качестве селективных детекторов (при тщательном выборе адсорбентов для заполнения ячейки) они будут широко использоваться, если удастся разработать промышленные модели "адиабатического" варианта.



Р и с. 7.15. Ионнообменная хроматограмма аминокислот, полученная с детектором по теплоте адсорбции.

в. Спектрофотометрические детекторы

В течение длительного времени для анализа и идентификации фракций, собранных при разделении на хроматографической колонке, использовались спектрофотометрический и колориметрический методы исследований. Поэтому в высокоэффективной хроматографии, о которой идет речь в данной книге, также часто используются непрерывный контроль элюентов в ультрафиолетовой или видимой области спектра.

В УФ-спектроскопии чаще всего применяются приборы двух типов. Один из них, УФ-спектрометр, измеряет поглощение раствором в широком диапазоне длин волны от менее чем 200 нм до видимой части спектра и может сканировать и записывать полный спектр. Прибор другого типа обеспечивает измерение поглощения только на нескольких специфических длинах волн (обычно 254 и 250 нм), а некоторые приборы этого типа работают только на первой длине волны. В этих приборах в качестве источников излучения используется эмиссия ртутной лампы низкого давления, фильтры и вторичная эмиссия других источников.

Приборы обоих типов должны иметь проточные ячейки, которые можно получить у изготовителей этих приборов.

Для некоторых целей вполне подходят более дешевые приборы с фиксированной длиной волны, они довольно широко используются

для рядовых анализов белков и нуклеиновых кислот. Если компоненты образца известны и те из них, которые нужно определить, имеют достаточное поглощение при фиксированной длине волны или при фиксированных длинах волн, то можно использовать этот дешевый тип прибора. Однако хроматография высокого разрешения в колонках в настоящее время используется главным образом в исследовательских анализах, где простые регистраторы недостаточны и следует предпочесть спектрометры с полным диапазоном длин волн.

Далее мы будем говорить об использовании именно таких приборов, хотя многие замечания в равной степени относятся и к более простому оборудованию.

Преимуществом УФ-детекторов является высокий отклик на большинство представляющих интерес материалов. Многие органические соединения, представляющие практический интерес в биологии, медицине и в промышленном органическом синтезе, содержат ароматические группировки, поглощающие в УФ-области. Хотя УФ-детекторы не являются универсальными по отклику, они очень селективны по отношению ко многим важным веществам. Кроме того, поскольку многие элюенты не поглощают в УФ-области (по крайней мере, в значительно широком диапазоне), УФ-детекторы отличаются высокой чувствительностью в хроматографии с градиентным элюированием; например, могут быть эффективно использованы градиенты с пентаном, метиленхлоридом и ацетонитрилом. УФ-спектры практически не зависят от температуры, образцы в детекторе не разрушаются, а при сканировании по всему диапазону длин волн часто становится возможной идентификация элюируемых пиков по спектру. Таким образом, УФ-детектор имеет существенные преимущества перед рефрактометром и детектором по теплоте адсорбции. Кроме того, сконструированы и эффективно используются [21] детекторы с малым мертвым объемом ячеек (< 10 мкл) и короткими коммуникациями, соединяющими детектор с колонкой.

Принципиальным недостатком УФ-детекторов является отсутствие универсального отклика, некоторые подходящие подвижные фазы являются непрозрачными по отношению к УФ-излучению в важной области длин волн. В табл. 3.4 приведены длины волн, при которых растворители перестают быть прозрачными.

Следует отметить, что вместо УФ-поглощения можно использовать УФ-флуоресценцию (УФФ). Процессы являются идентичными, но флуоресцентный вариант имеет два важных преимущества: более высокую чувствительность (вероятно, на 1–2 порядка) и селективность, которую можно достичь при изменении падающего излучения и сканировании флуоресценции во всем диапазоне длин волн. Первое преимущество соответствует желанию хроматографистов всегда использовать как можно меньшие образцы для достижения более вы-

сокого разрешения и необходимости получать информацию о все меньших количествах материала или о компонентах, присутствующих в ультраследовых количествах. Селективность УФФ имеет большое значение для качественного анализа элюатов и определения плохо разделенных веществ, из которых необходимо определить только одно.

Фотометрические детекторы используют для измерения поглощения в видимой области спектра, поэтому большинство органических веществ перед определением необходимо превратить в окрашенные производные. Потенциальные возможности этого метода большие. Чтобы оценить их, достаточно вспомнить чрезвычайно большое разнообразие как общих, так и селективных реагентов для опрыскивания, используемых в хроматографии в тонком слое /22/ (см. табл. 6.2). Однако при использовании этого метода для непрерывного контроля возникает ряд проблем.

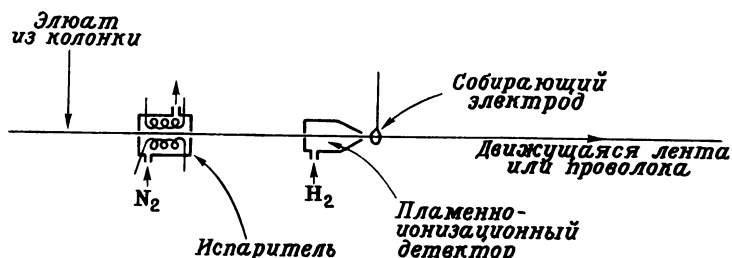
Наиболее серьезными являются трудности, обусловленные низкими скоростями реакций и значительным размыванием полос, которое может возникнуть при введении реагента и происходящего в результате этого диффузионного смещения. Однако эти затруднения вполне преодолимы и можно уверенно предсказать, что в дальнейшем такой подход будет использоваться достаточно хорошо, хотя в настоящее время широко применяется только один тип такого детектора — аминокислотный анализатор, в котором используется реакция с нингидрином.

Итак, фотометрические детекторы являются селективными и часто имеют высокий отклик. На их работу мало влияет изменение окружающей среды, и поэтому их легче использовать, чем многие другие. Однако фотометрические детекторы в настоящее время дорого стоят. В будущем при использовании подходящих и быстрых химических превращений фотометрические детекторы можно будет сделать селективными и чувствительными почти к любому типу органического вещества.

2. Транспортно-ионизационные детекторы

Во-первых, необходимо объяснить загадочное наименование, данное этому классу детекторов. Основные элементы детектора этого типа показаны схематически на рис. 7.16. Элюат из колонки попадает на "транспортёр" в виде движущейся металлической проволоки, цепи или ленты. Вместе с транспортёром элюат проходит через нагретую камеру, которую обычно продувают азотом, чтобы удалить избыток летучей подвижной фазы. Менее летучие растворенные вещества остаются на металлическом транспортёре и переносятся в ионизационный детектор такого же типа, который обычно используется в газовой хроматографии /23/. В некоторых конструкциях транспортёр проходит непосредственно через водородное пламя, в других —

растворенное вещество подвергается пиролизу, и в ионизационный детектор (аргонный, пламенный или электронного захвата) попадают продукты пиролиза. Таким образом, детектирование обязательно предусматривает транспорт последовательно вымываемых пиков, удаление подвижной фазы и высокочувствительное ионизационное детектирование разделенных веществ.



Р и с. 7.16. Отдельные узлы транспортно-ионизационного детектора.

В настоящее время выпускается по крайней мере пять промышленных вариантов приборов этого типа, в одном из которых можно использовать ионизационный детектор любого типа. Прежде чем сравнивать различные конструкции, обсудим преимущества детектора указанного типа, которые настолько велики, что при тщательном выборе лучшей из возможных конструкций этот тип детектора может стать наиболее распространенным прибором по меньшей мере для гидрофобных образцов с температурами кипения выше 250°C . Такая система имеет следующие преимущества: 1) отсутствие отклика на подвижную фазу (которая никогда не должна попадать в детектор), 2) нечувствительность к температуре, скорости потока и другим факторам, зависящим от окружающей среды, 3) очень высокая чувствительность по разделяемым веществам. Эти детекторы стоят умеренно дорого, относительно просты в обращении, разрушают часть растворенного вещества и вносят сравнительно небольшой вклад в размывание полосы анализируемого вещества. Потенциальные возможности указанной системы в настоящее время не используются ни в одном из выпускаемых промышленностью приборов. Кроме того, не вполне доказана применимость этих детекторов для количественных измерений (транспорт переносит в детектор только небольшую часть элюата). Предположение, согласно которому эта часть является всегда одной и той же и не зависит от типа вещества и состава подвижной фазы при градиентном элюировании, до сих пор не обосновано.

Далее мы обсудим более подробно методы нанесения элюата на транспортер, тип транспортирующей системы, конструкцию испарителя подвижной фазы, способы передачи растворенного вещества от транспортера к ионизационному детектору, ионизационный детектор и методы очистки транспортера.

Вытекающий из колонки элюат попадает на транспортер, который, двигаясь непрерывно мимо выхода колонки, переносит более или менее постоянную часть элюата в детектор. Количество элюата, попадающего на транспортер, а следовательно, и чувствительность детектора зависят от типа и геометрии транспортера. Количество захваченной транспортером подвижной фазы зависит также от вязкости и поверхностного натяжения элюата и смачиваемости металла. Хороший контакт жидкости с транспортером может быть достигнут при прохождении его через каплю жидкости на выходе из колонки, при использовании цепных и ленточных транспортеров (см. следующий раздел) элюат капает на двужуший металл. Ту часть элюата, которую транспортер не уносит, можно собрать в коллекторе фракций для дальнейшего исследования.

Различные транспортирующие системы отличаются по материалу, из которого выполнена конструкция, типу транспортера (проволока, цепь или лента) и способу обеспечения непрерывного переноса вещества (системы в виде непрерывно циркулирующей петли или в виде очень длинной движущейся в одном направлении проволоки). В замкнутых системах обычно применяются цепи или ленты, изготовленные из платины или золота. В системах, где транспортер движется в одном направлении, обычно используют железную проволоку.

Главный недостаток "бесконечной" цепи или ленты состоит в том, что любой плохо сгорающий или пиролизующийся материал, остающийся на транспортере, дает дополнительный сигнал каждый раз, когда он проходит через детектор. Это особенно характерно для цепных транспортеров, поскольку вещество задерживается между звеньями и лишь медленно удаляется оттуда. Кроме того, цепи транспортеров этого типа довольно часто ломаются.

Транспортеры с "бесконечной" лентой имеют следующие преимущества: 1) поскольку это короткий транспортер, то его можно сконструировать из дорогих инертных материалов, например платины или золота; 2) он способен нести в несколько раз большую долю общего количества элюата, чем одиночная проволока. Если использовать ленту с корытообразной формой поперечного сечения, то можно было бы даже рассмотреть вопрос о полном переносе элюата. Главным препятствием для транспортировки большого количества элюата, помимо фактической емкости транспортера, является необходимость предотвращения размывания полосы, обусловленного диффузией или даже конвекцией или течением элюата при его переносе от выхода из колонки

до испарителя. Тем не менее транспортеры этого типа, по-видимому, могут переносить количественно ограниченные объемы элюата из микроколонок к детекторам.

Среди преимуществ проволочного транспортера следует отметить его низкую стоимость (цена железной проволоки подходящего диаметра в настоящее время примерно равна 10 долл. за 20 000 м). Время пробега катушки проволоки (обычно скорость пробега проволоки $6 \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$) составляет 90 ч. Поэтому, используя единственный незагрязненный транспортер, можно провести много анализов или очень длительное разделение. На практике это преимущество полностью не реализуется, поскольку при производстве проволока протягивается через смазанные маслом дюзы и небольшие количества органического материала остаются на металле. В результате при пропускании "чистой" проволоки через пиролизную печь наблюдается шум детектора. Чтобы выжечь загрязняющие масла, некоторые исследователи использовали прямое нагревание: через проволоку пропускают электрический ток и нагревают ее до красного каления вдали от точки соприкосновения с элюатом, другие — заранее пропускали неиспользованную проволоку через систему.

Проволочные транспортеры имеют сравнительно малую емкость, что обусловлено малой поверхностью проволоки. Именно поэтому встает вопрос о смачиваемости транспортеров. Однако, основываясь на собственном опыте, авторы считают, что связанные с этим трудности возникают главным образом при работе с водными подвижными фазами. Одна из фирм, выпускающих детекторы с проволочным транспортером, специально отмечает, что "поверхность проволоки модифицирована таким образом, что она смачивается водными и органическими растворителями. В результате процесс отбора образца происходит равномерно и непрерывно". Вероятно, проще всего добиться хорошего смачивания, если предварительно нагревать проволоку на воздухе с тем, чтобы получить на поверхности проволоки пористую окисную адсорбирующую оболочку.

Хотя в принципе испаритель растворителя является простым устройством (нагреваемая, продуваемая газом камера), в процессе ее использования возникает ряд практических проблем. Критическим параметром является температура, при которой работает испаритель. Время нахождения в камере, а поэтому в большинстве случаев и длина испарителя — фактор второстепенный. В испарителе подвижная фаза должна удаляться таким образом, чтобы все растворенные вещества остались на транспортере. Проще всего обстоит дело в тех случаях, когда для разделения полимеров используется действительно летучий элюент, например пентан. Однако при испарении подвижной фазы, очень сильно отличающейся по летучести, необходимо решить ряд задач. Так, слишком быстрое испарение ведет к разбрызгиванию

и, следовательно, потере анализируемого вещества; при слишком быстром высыхании краски нелетучие слои растворенных веществ на транспортёре могут вспучиваться и расслаиваться. Кроме того, полимеры обычно прочно удерживают следы растворителей.

При детектировании более летучих веществ (например, с температурой кипения ниже примерно 300°C) при испарении элюента частично теряются и анализируемые компоненты, в результате чувствительность детектирования снижается. Это своего рода крайние случаи, но имеется целый ряд веществ, которые очень удобно анализировать с помощью детектирующих систем транспортного типа.

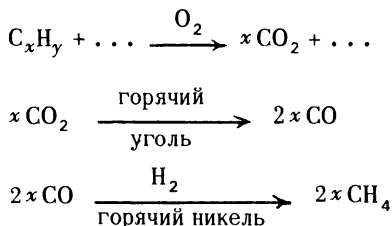
Итак, мы рассмотрели, как анализируемое вещество, свободное от элюента, попадает на транспортёр. В настоящее время в основном применяются две системы переноса вещества в ионизационный детектор. В литературе описана новая, весьма многообещающая система, возможно, что и она вскоре будет использоваться в стандартных установках*. В первой и наиболее прямой системе транспортёр проходит непосредственно через пламя пламенно-ионизационного детектора. Вещество сгорает, предполагается, что полностью, а образовавшиеся ионы собираются обычным путем. Эта система критиковалась, так как при прямом движении через пламя возникают шумы. Причем в вершине пика, такого присущего пламени шума, сгорают и нелетучие углеродсодержащие загрязнения, так что при использовании загрязненного транспортёра с "бесконечной" лентой на "действительную" хроматограмму, по-видимому, накладывается регулярный сигнал. Это подтверждают наблюдения, проведенные в лаборатории авторов.

Во второй системе переноса растворенного вещества с транспортёра в детектор, реализованной в промышленных образцах приборов, проводится пиролиз соединений, находящихся на проволоке, ленте или цепи. Большинство органических материалов разлагается при нагревании до температур выше 500°C , продукты пиролиза, как правило, легко летучи (для большинства органических веществ, пиролизующихся в течение нескольких секунд при $\sim 700^{\circ}\text{C}$, свыше 90% продуктов пиролиза кипят ниже 150°C). Таким образом, при пиролизе вещества с транспортёра попадают в поток газа, который несет продукты пиролиза в ионизационный детектор. При этом проблема шума, связанная с прохождением транспортёра непосредственно через пламя, исключается.

Третья система является вариантом предыдущей, но в ней используется не пиролиз, а сгорание. Все органические вещества на тран-

*Фирма "Руе" уже рекламирует жидкостной хроматограф модели CM2, в котором используется эта система детектирования [J. Chromatography Sci., 8 (1971)] – *Прим. перев.*

спортере сжигаются, затем продукты сгорания пропускаются над горячим углем и после смешения с водородом – над горячим никелем, а затем поступают в пламенный (или аргоновый) ионизационный детектор. При этом протекают следующие реакции:



В результате каждый моль образовавшегося вначале CO_2 дает два моля метана. Метан, конечно, детектируется на очень низком уровне с помощью ионизационных детекторов. Мартин и Скотт /24, 25/ описали эту систему, названную "молекулярным умножителем", и показали, как ее можно использовать для увеличения чувствительности детектирования. После завершения каждого цикла последовательных окислительных и восстановительных ступеней количество детектируемого материала удваивается; так что при использовании десяти таких циклов теоретически чувствительность может увеличиться на три порядка.

Можно ожидать, что использование таких процессов приведет к появлению детекторов ультравысокой чувствительности, откликающихся количественно на число углеродных атомов, присутствующих в детектируемом веществе*.

Последние две особенности транспортно-ионизационных детекторов можно рассмотреть вкратце.

Во-первых, выбор ионизационного детектора. Хотя в ЖХ-системах вначале использовался преимущественно аргоновый детектор, в настоящее время его вытеснил пламенно-ионизационный детектор. Характеристики этих детекторов подробно описаны в руководствах по газовой хроматографии. По существу каждый детектор такого типа дает универсальный отклик на органическое вещество, и в будущем системы такого рода (подобные системам молекулярного умножения) наверняка будут применяться для превращения определенных компонентов в такую форму, которая дает высокий сигнал в том или ином из селективных детекторов, приобретающих важное значение в газовой хроматографии. Например, пиролизическое восстановление растворенных веществ, перенесенных транспортером в пламенно-фотометрическом или микрокулонометрическом детекторе, можно будет

* См. сноску на стр. 225. – *Прим. перев.*

использовать в "хроматографии серы", в основу которой будет положено детектирование сероводорода.

Транспортеры (особенно с "бесконечной" лентой или цепью) необходимо очищать от любого остающегося материала после того, как анализируемое вещество перенесено к детектору.

В настоящее время используют только нагревание и промывание в растворителях. Эффективность такой очистки может быть самой разной.

Мы уделили много внимания транспортно-ионизационным детекторам, подчеркивая их универсальность, возможность дальнейшего усовершенствования и более широкого использования, так как считаем, что из всех известных типов детекторов, применяемых в высокоэффективной жидкостной хроматографии, только такие детекторы отвечают трем основным требованиям: чувствительность, универсальность отклика и простота использования.

д. Детекторы по радиоактивности

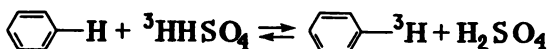
Методы работы с мечеными атомами широко используют в химических и биохимических исследованиях уже в течение двух десятилетий. Несколько лет назад был описан /27/ и поступил в продажу детектор для индикации меченых соединений, разделенных методом газовой хроматографии. Недавно для использования в качестве детектора в жидкостной хроматографии была разработана жидкостная сцинтилляционная система отсчета соединений, меченных ^{14}C и ^3H (см. приложение). Хроматографический раствор проходит через стеклянную трубку, заполненную сцинтиллятором, например порошком антрацена. Размещенный соответствующим образом фотоумножитель детектирует вспышки света, возникающие при попадании β -частиц на сцинтиллятор, а результирующий сигнал на выходе фотоумножителя записывается в виде хроматограммы.

Детекторы этого типа имеют очень специфическое назначение и применимы только для довольно сложных исследований. Однако мы рассмотрим эти детекторы несколько подробнее, так как они отличаются очень высокой чувствительностью.

Можно легко детектировать скорости распада порядка 100 мин^{-1} , что эквивалентно детектируемому пределу 10^{-12} – 10^{-14} г изотопа ^{14}C или ^3H . Это очень высокая чувствительность по сравнению с большинством существующих детекторов. Если учесть, что обмен водорода в большинстве случаев происходит довольно легко, то станет ясно, что более широкое использование детекторов по радиоактивности вполне возможно.

Обмен протонов в гидроксильных или карбоксильных группах хорошо известен. Протоны в ароматических ядрах будут

обмениваться с протонами серной кислоты, содержащей тритий:



По-видимому, тритий можно ввести во многие сложные образцы путем проведения довольно простых химических реакций обмена перед хроматографированием и затем после разделения детектировать анализируемые вещества с помощью чрезвычайно чувствительных радиоактивных детекторов. Поэтому, если чувствительность обычных детекторов не удастся больше повысить, то, возможно, возрастет интерес к детекторам такого типа, которые являются наиболее чувствительными индикаторами ультрамалых образцов в высокоэффективной ЖХ. Помимо высокой чувствительности, детекторы по радиоактивности имеют следующие преимущества: совершенно нечувствительны к подвижной фазе (если только не происходит обмена между ней и меченым веществом) и изменениям в окружающей среде. Очевидными недостатками их являются ограниченная применимость и высокая стоимость.

е. Детекторы по электропроводности

Измерения проводимости в течение длительного времени играли важную роль в определении веществ, особенно в водных растворах. Обычно пробник для измерения проводимости состоит из двух плоских параллельных платиновых электродов, погруженных в предназначенный для измерения раствор, и образует плечо моста Уитстона. При замене пробника на проточную ячейку малого объема с тщательно смонтированными маленькими электродами и использовании современных методов измерения тока можно создать приборы для контроля по электропроводности, пригодные для использования при работе с водными и неводными растворами в жидкостной хроматографии. В работах /27–29/ даны описания нескольких детекторов по электропроводности, одни из которых имеют очень маленький объем, другие – высокую чувствительность. Все они были сконструированы и проверены в первую очередь для водных систем. Эти детекторы или их усовершенствованные варианты можно использовать и в неводной ЖХ (о которой говорится в данной книге). В наиболее интересной статье по проводимости полярных жидкостей Брайт и Мейкин /30/ отмечают, что в случае полярных жидкостей при использовании современных методов очистки, включающих применение ионообменных смол, может быть достигнуто очень значительное увеличение сопротивления. Например, сопротивление нитробензола при обработке ионо-

обменными смолами в течение нескольких минут возрастает с $2 \cdot 10^6 \text{ ом} \cdot \text{м}^{-1}$ до $\sim 10^8 \text{ ом} \cdot \text{м}^{-1}$. Аналогичное увеличение сопротивления органических жидкостей, возможно, могут давать и другие материалы, используемые в качестве хроматографических неподвижных фаз. Проведенные наблюдения позволяют сделать следующие выводы. Во-первых, подвижные фазы и большинство органических образцов, используемых в жидкостной хроматографии, являются действительно очень плохими проводниками. Во-вторых, как удалось показать, следы полярных компонентов, удаляемые из органических материалов, имеют намного более высокую проводимость. Таким образом, по-видимому, детектирование по электропроводности может стать очень полезным методом контроля при разделении микропримесей, присутствующих в следовых количествах в органических материалах. Это очень важно, так как такие компоненты могут играть заметную роль в создании опасного электрического заряда при протекании потоков органических жидкостей, например нефтепродуктов в трубопроводах.

Изложенная точка зрения является полностью умозрительным заключением о возможности более широкого использования детекторов, широко и успешно используемых в настоящее время для контроля многих неорганических и биохимических разделений методом ЖХ в колонках.

Главными преимуществами этих детекторов при использовании с большинством водных элюатов являются отсутствие отклика на подвижную фазу, довольно высокий сигнал, величину которого можно предсказать по данным о проводимости, нечувствительность к умеренным изменениям температуры и скорости потока, неdestructивный характер детектирования и, что особенно важно, простота изготовления и использования. Хотя, как утверждают, большинство детекторов по электропроводности имеет линейную зависимость сигнала от концентрации, ячейка малого объема, описанная Пексоком и Сондерсом [27], не обладала такой характеристикой, и возможно, что при работе этого детектора в частично или полностью неводных средах нелинейность станет серьезным ограничением.

7.9.3. Экспериментальные системы детектирования

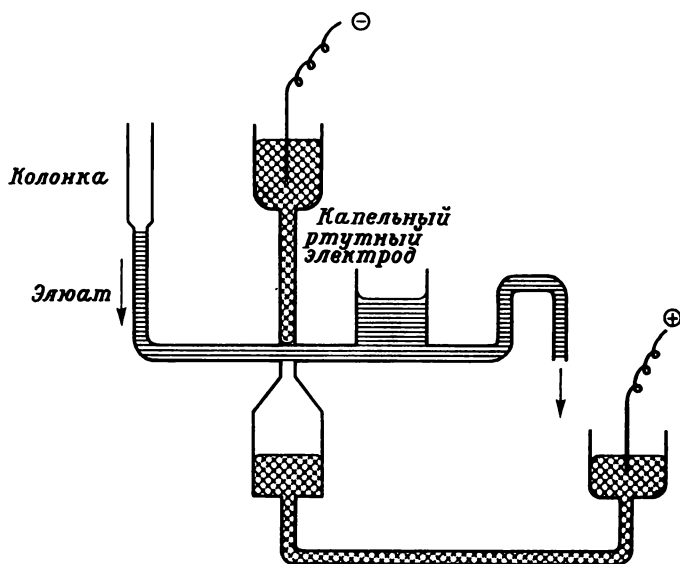
Помимо систем для непрерывного контроля вытекающего раствора, уже освоенных промышленностью, имеется ряд систем, которые могут оказаться полезными, и, вероятно, некоторые из них поступят в продажу еще до того, как будет опубликована эта книга.

а. Полярографические детекторы

Соединения, претерпевающие электрохимические реакции, могут быть детектированы полярографически; так, Кемуля уже на протяже-

нии нескольких лет использует полярографический детектор для контроля хроматографических разделений в жидкой фазе. Эта система, названная Кемулей "хроматополярографией", была описана в 1952 г. /31/, а последующие работы того же автора продемонстрировали ее применимость к нитросоединениям и изомерам ДДТ /32/, аминокислотам /33/, алкалоидам /34/ и альдегидам и кетонам /35/. С современным состоянием этих исследований можно познакомиться по работе /36/. Приведенные в ней данные показывают, что указанным методом можно детектировать малые количества разнообразных органических веществ. Вопрос о применимости указанного метода в высокоскоростной высокоэффективной хроматографии в работе /36/ не рассматривается.

Конструкция, рабочие характеристики и результаты использования дешевого полярографического детектора, специально сконструированного для использования с высокоэффективными колонками, обсуждаются в работе /37/. Отличительные черты этой системы: малый



Р и с. 7.17. Полярографический детектор

мертвый объем между выходом колонки и выходом детектора (включая, конечно, и полярографическую ячейку); большая, чем обычно используют в полярографии, скорость капания (для того, чтобы более точно измерять быстро элюируемые пики) и электрическая схема, обеспечивающая более селективное демпфирование с целью подавить

флуктуации тока, которые возникают из-за высокой частоты капания ртути. Конструкция детектора проста (рис. 7.17). Для этого детектора детектируемый предел концентрации образца составляет 10^{-8} моль \cdot л $^{-1}$ для *n*-нитрофенола, метилпаратиона и паратиона. Полярографический детектор не имеет универсального отклика на все вещества и чувствителен к электроактивным загрязнениям, таким, как кислород или ионы металлов. Кроме того, при работе с данным детектором необходимо, чтобы электрод имел сравнительно высокую проводимость, поэтому выбор подвижной фазы для органического анализа, а следовательно, и применимость в органической химии ограничены. Но сравнительно высокий и селективный отклик по отношению к некоторым растворенным веществам в сочетании с малым мертвым объемом позволяют считать, что полярографический детектор может стать ценным селективным детектором в будущем.

б. Детекторы по теплоте реакции

Эта система детектирования имеет общие черты как с детектором по теплоте адсорбции, так и с фотометрическим детектором. Детектирование основано на измерении изменения температуры, сопутствующего любой реакции, происходящей при добавлении реагента к вытекающему из колонки раствору. Система этого типа для непрерывного контроля заводских потоков описана в работе /38/. В этой системе триэтилалюминий реагировал с различными загрязнениями (вода, растворенный кислород и спирты) в потоке углеводородов. Реакция проходила в тщательно термостатированной ячейке ($\pm 0,002^\circ\text{C}$), и теплота реакции измерялась с помощью термистора.

Эта система обеспечивает селективное детектирование и так же, как и фотометрические детекторы, имеет широкий диапазон селективности. Главная трудность состоит в том, чтобы найти достаточно быструю реакцию, завершающуюся меньше чем за 30 с. Как и в случае с детектором по теплоте адсорбции, необходимо очень хорошее термостатирование или электрическая компенсация изменений температуры. Однако детектор по теплоте реакции в отличие от детектора по теплоте адсорбции обладает селективностью и поэтому может стать очень полезным для рядовых анализов после того, как разработан подходящий режим разделения на колонке. Важное различие между двумя детекторами заключается в том, что система по теплоте реакции дает обычные гауссовы пики, а не "дифференциальные пики", присущие детектору по теплоте адсорбции. Вследствие того что обычно теплота реакции значительно больше, чем теплота адсорбции, детекторы по теплоте реакции потенциально более чувствительны, кроме случая хемосорбции, когда (как, например, при адсорбции на ионообменных смолах) теплота сорбции имеет такой же порядок величины, что и теплоты реакции. Однако в связи с тем, что детектор по теп-

лоте реакции требует дополнительного смешивания реагентов, огромное значение имеет конструкция ячейки, и она может вносить значительный вклад в размывание полосы. В этом отношении детекторы по теплоте реакции и колориметрические детекторы имеют недостатки по сравнению с системами детектирования по теплоте адсорбции.

Авторы полагают, что детекторы по теплоте реакций (так же, как колориметрические детекторы) могут быть усовершенствованы и обеспечат чувствительное, селективное детектирование с широким изменением селективности, обеспечиваемым одной реакционной ячейкой и набором подходящих реагентов, которые можно в нее подать.

в. Детекторы по плотности

Существует прототип детектора по плотности, позволяющий записывать очень небольшие изменения в плотности элюата. Раствор, выходящий из колонки, протекает через ячейку, содержащую политетрафторэтиленовый поплавок с магнитом. Расположенный снаружи магнит удерживает поплавок на подходящей высоте над основанием ячейки в таком положении, что поплавок прерывает луч света, падающий через ячейку на фотоэлемент. При изменении плотности раствора положение поплавка слегка меняется и количество света, падающее на фотоэлемент, соответственно изменяется. Утверждают, что этот детектор дает отклик на изменение плотности раствора в $0,002 \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$. Плотность обычных подвижных фаз составляет $0,65\text{--}0,9 \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$, а растворенные вещества, такие, как алкалоиды, углеводы, нитросоединения и большие органические молекулы, имеют плотность между 1 и $2 \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$. Поэтому при указанной чувствительности прототипа для растворенного вещества с плотностью $1,2 \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$ при плотности подвижной фазы $0,9 \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$ возможно детектирование минимум 0,1 % растворенного вещества. Это на два-три порядка меньше, чем необходимо для работы с хорошим разрешением. Маловероятно, чтобы детекторы по плотности можно было усовершенствовать до требуемого уровня чувствительности. Поскольку в системе "поплавок в ячейке" сложно уменьшить размывание пика, то маловероятно, чтобы эта система нашла широкое применение в будущем.

г. Детекторы по диэлектрической проницаемости

Поддерживая высокий потенциал между близко расположенными параллельными или концентрическими элементами, можно измерить изменения в диэлектрической проницаемости (т.е. электрическую поляризуемость) жидкости, протекающей между элементами. Этот принцип используется в детекторах по диэлектрической проницаемости. Почти во всех отношениях диэлектрическая проницаемость является электрическим аналогом показателя преломления. Однако существует

одна особенность, из-за которой метод измерения хроматографической проницаемости менее пригоден в хроматографии, чем метод измерения показателя преломления. Между изменением диэлектрической проницаемости соединений и расположением их в элюотропных рядах ("полярностью") наблюдается параллелизм; в случае показателя преломления такого параллелизма не наблюдается. Приведенные в табл. 7.4 данные показывают, что n_D меняется незначительно для ряда пентан, толуол, диэтиловый эфир, ацетон, изопропанол; исключение составляет только толуол, в этом случае присутствие ароматического кольца ведет к более высокому показателю преломления, чем для остальных веществ. В то же время величины диэлектрических проницаемостей для соединений этого ряда прогрессивно возрастают (пентан 1,844, толуол 2,379, диэтиловый эфир 4,335, изопропанол 18,3). Поскольку в жидкостной адсорбционной и до некоторой степени в распределительной хроматографии полярность идеального элюента должна быть близка к полярности разделяемых веществ (поэтому, например, используют градиентное элюирование), условия хроматографирования требуют уменьшения разности в диэлектрических проницаемостях разделяемых веществ и подвижной фазы. Вызванная этим потеря потенциально возможной чувствительности только частично может компенсироваться более высокой точностью измерения электрических свойств растворов по сравнению с оптическими. В настоящее время о конструкции и характеристике детекторов по диэлектрической проницаемости известно слишком мало, чтобы быть уверенным, что они будут использоваться. В настоящее же время они не дают каких-либо значительных преимуществ по сравнению с детекторами, уже выпускаемыми промышленностью.

д. Детекторы по упругости пара

Детекторы по упругости пара описаны несколькими группами исследователей /40-43/. Эти детекторы основаны на том же принципе, что и осмометры, широко используемые для измерения средних молекулярных весов нелетучих растворенных веществ. Поулсен и Енсен /43/ исследовали применимость такого детектора для жидкостной элютивной хроматографии, пытаясь повысить чувствительность и уменьшить мертвый объем детектора. Их детектор имел предел детектирования порядка 10^{-5} г растворенного вещества с молекулярным весом 200 в полосе шириной 1 мл и минимальный мертвый объем около 10 мкл; однако мертвый объем возрастал с увеличением скорости потока. Чувствительность такого детектора приближается к необходимой для работы с малыми образцами при высоком разрешении а его мертвый объем при благоприятной скорости достаточно мал. Преимуществами детектирующей системы указанного типа являются фактическая универсальность отклика, величину которого можно пред-

сказать, линейное изменение сигнала с концентрацией, кроме того, анализируемое вещество не разрушает. К числу недостатков относятся необходимость того, чтобы растворенные вещества были существенно менее летучи, чем растворитель, и довольно большой мертвый объем при высоких скоростях потока (например, 90 мкл при 2 мл·мин⁻¹). Последнее обстоятельство может препятствовать использованию детектора в быстрых анализах, где скорость потока повышают до ~ 1 мл·мин⁻¹.

ПРИЛОЖЕНИЕ

КРАТКИЙ СПРАВОЧНИК ПО ОБОРУДОВАНИЮ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В КОЛОНКАХ

Сита

A. Fritsch OHG, 6580 Idar-Oberstein 1, Hauptstrasse 542, W. Germany	Стандартные сита с устройством для промывания водой
Endecoys Ltd., Lombard Rd., London S. W. 19, G.B.	Стандартные сита до 5,5 мкм
Veco N.V., Karel van Glereweg 22, Eerbeek, Netherlands	Электротравленные сита до 5 мкм
J. Engelsmann A.G., Frankenthaler Stras- se 137-141, 67 Ludwigshaven, W. Germany	Стандартные сита до 25 мкм

Оборудование для измельчения

A. Fritsch OHG, 6580 Idar-Oberstein 1, Hauptstrasse 542, W. Germany	Ступка и пестик с механическим приводом
G.E.C. (Engineering) Ltd., Fraser & Chal- mers Eng. Works, Erith, Kent, G.B.	Высокочастотная вибрационная мельница

Насосы

	Тип	Максимальное давление, атм
Cenco Instruments N.V., Konijnenberg 40, Breda, Netherlands	Плунжерный	66
Phoenix Precision Instruments Co., Inc., 3803 N. Fifth St., Philadelphia, Pa.	Градиентный	66
Metering Pumps Ltd., 49-51 Uxbridge Road, Ealing, London W. 5, G.B.	Плунжерный	660
Bran and Luebbe (G.B.) Ltd., 62 Coventry Rd., Market Harborough, Leicester, G.B.	Плунжерный	2000
Orlita KG., 63, Giessen-Lahn, Max Eyth Strasse 10, W. Germany	Диафрагменный	325
Waters Associates Inc., 61 Fountain Street, Framingham, Mass. 01701	Беспульсационный	~ 10
Milton Roy Co., St. Petersburg, Fla. 33733	Различные типы	500
Whitey Research Tool Co., 5679 Landregan St., Emeryville, Calif. 94608	Диафрагменный	350

F.A. Hughes & Co.Ltd., Blenheim Road, Epsom, Surrey, G.B.	Плунжерный	150	
Technicon Corp., Chauncey, New York	Плунжерный	66	
Nester/Faust Inc., 2401 Ogletown Road, Newark, Del. 19711	Беспульсационный поршневой	100	
Isco, 4700 Superior, Lincoln, Neb. 68504	Диафрагменный	5	
<i>Демпферы пульсаций</i>			
Gauges-Bourdon (G.B.) Ltd., Bramley, Guildford, Surrey, G.B.	Трубка Бурдона		
Fawcett Preston & Co.Ltd., Bromborough, Cheshire, G.B.	Гидродинамические аккумуляторы		
<i>Краны-дозаторы</i>			
	Емкость, мкл	Максимальное давление, атм	Максимальная температура, °C
Seiscor, Box 1590, Tulsa, Okla.	0,5	100 25	150 220
Valco Insts., P.O. Box 19032, Houston, Tex. 77024	0,2–50	140	300
Gervase Insts. Ltd., 3, Kingsway Gdns., Chandlers Ford, Hants, G.B.	1–50	14	200
Tracor Inc., Analytical Instrument Division, 6500 Tracor Lane, Austin, Tex. 78721	0,25–10	66	220
<i>Детекторы</i>			Изготавливаемые типы*
LKB-Produkter A.B., P.O. Box 76, Stock- holm-Bromma, Sweden		c, g	
Instrumentation Specialities Co., Inc., 4700 Superior, Lincoln, Neb. 68504		c	
Nester/Faust Inc., 2401 Ogletown Rd., Ne- wark, Del. 19711		a, b, c, e, g	
E.I. du Pont de Nemours, Wilmington, Del. 19898		a, d	
Carlo Erba, Via Carlo Imbonati, 24, Milan, Italy		e	
Varian-Aerograph Inc., 2700 Mitchell Drive, Walnut Creek, Calif. 94598		a, b, c	
Waters Associates Inc., 61 Fountain St., Framingham, Mass. 01701		a, c	

* Обозначения типов детекторов: а – рефрактометрические; б – по теплоте адсорбции; с – по поглощению в УФ или видимой части спектра (в заданном диапазоне длин волн); d – по поглощению в УФ или видимой части спектра; е – транспортно-ионизационные; f – по радиоактивности; g – по электропроводности.

Cenco Instruments Corp., Konijnenberg 40, Breda, The Netherlands	c
Technical Measurement Corp., 441 Wash- ington Ave., North Haven, Conn. 06473	d
Japan Electron Optics, Laboratory, Co. Ltd., 1418 Nakagami, Akishima Tokyo, Japan	e
E-C Apparatus Corp., University City, Phi- ladelphia, Pa. 19104	a
N.V. Philips Gloeilampenfabrieken, Eind- hoven, The Netherlands	f
Barber-Colman Inc., Rockford, Ill. 61101	e
Pye-Unicam Ltd., York St., Cambridge, G.B.	e
Packard Instrument Co., Inc., 2200 Warren- ville Rd., Downers Grove, Ill. 60515	e
Chromatronix, Inc., 2743 Eighth St., Ber- keley, Calif. 94710	g
Laboratory Data Control, 42 Shelter Road, P.O. Box 1030 Danbury, Conn. 06810	a, c

Комплектные жидкостные хроматографы

- Waters Associates, Inc., 61 Fountain St. Framingham, Mass.
 Du Pont Instruments, Inc., Wilmington, Del. 19898
 Nester Faust Manufacturing Corp., 2401 Ogletown Road, Newark, Del. 19711
 Varian Aerograph, 2700 Mitchell Drive, Walnut Creek, Calif. 94598
 Siemens Aktiengesellschaft, D7500 Karlsruhe 21, P.O. Box 211080, W. Germany
 Problematics Inc., 223 Crescent St., Waltham, Mass. 02154.

Список литературы

1. 1969–1970, Laboratory guide, Anal. Chem., July 1969.
2. International chromatography guide, J. Chromatog. Sci., May 1969.
3. Johnson J.F., Cantow M.R., J. Chromatog., **28**, 128 (1967).
4. Snyder L.R., Saunders D.L., J. Chromatog. Sci., **7**, 195 (1969).
5. Rosett T., J. Chromatog., **18**, 498 (1965).
6. Middleton W.R., Anal. Chem., **39**, 1839 (1967).
7. Hurrell R.A., Amos R., in "Gas Chromatography 1962", van Swaay M., ed., Butterworth, London, 1963, p. 162.
8. Scott R.P.W., Blackburn D.W.J., Wilkins T., J. Gas Chromatog., **5**, 182 (1967).
9. Stewart H.N.M.S., Amos R., Perry S.G., J. Chromatog., **38**, 209 (1968).
10. Huber J.F.K., personal communication.
11. Halasz L., Walking P., J. Chromatog. Sci., **7**, 129 (1969).
12. Maggs R.J., Young T.E., in "Gas Chromatography 1968", Harbourn C.L.A., ed., Institute of Petroleum, London, 1969, p. 217.
13. Snyder L.R., J. Chromatog. Sci., **7**, 352 (1969).
14. Giddings J.C., Dynamics of Chromatography, Part I, Marcel Dekker, New York, 1965. p. 281

15. *Piel E.V.*, Anal. Chem., **38**, 670 (1966).
16. *Snyder L.R.*, Anal. Chem., **39**, 698 (1967).
17. *Huber J.F.K.*, J. Chromatog. Sci., **7**, 172 (1969).
18. *Billmeyer F.W., Jr., Kelley R.N.*, J. Chromatog., **34**, 322 (1968).
19. *Bombaugh K.J., King R., Cohen A.J.*, J. Chromatog., **43**, 332 (1969).
20. *Smuts T.W., van Niekerk F.A., Pretorius V.*, J. Chromatog. Sci., **7**, 127 (1969).
21. *Kirkland J.J.*, Anal. Chem., **40**, 391 (1968).
22. *Stahl E.* (ed.), Thin Layer Chromatography, 2nd English ed., Springer-Verlag, Berlin, 1969.
23. *Littlewood A.B.*, Gas Chromatography, 2nd ed., Academic Press, London and New York, 1970.
24. *Martin A.J.P., Scott R.P.W.*, Las Vegas Symposium, 1969.
25. *Scott R.P.W.* in "Gas Chromatography in Biology and Medicine", Porter R., ed., Churchill, London, 1969, p. 54–56.
26. *James A.T., Piper E.A.*, J. Chromatog., **5**, 265 (1961).
27. *Pecsok R.L., Saunders D.L.*, Anal. Chem., **40**, 1756 (1968).
28. *Knudson G., Ramaley L., Holcombe W.A.*, Chem. Instr., **1**, 325 (1969).
29. *Taylor A.F.*, Analyst, **88**, 145 (1963).
30. *Bright A.W., Makin B.*, J. Mat. Sci., **2**, 184 (1967).
31. *Kemula A.*, Roczniki Chem., **26**, 281 (1952).
32. *Кемула А.*, Журн. анал. хим., **22**, 562 (1967).
33. *Kemula W., Witwicki J.*, Roczniki Chem., **29**, 1153 (1955).
34. *Kemula W., Stachurski Z.*, Roczniki Chem., **30**, 1285 (1956).
35. *Kemula W., Butkiewicz D., Sybitska D.*, Modern Aspects of Polarography, Plenum Press, New York, 1966, p. 36.
36. *Kemula W., Sybitska D.*, Anal. Chim. Acta, **38**, 97 (1967).
37. *Koen J.G., Huber J.F.K., Poppe H., den Boef G.*, J. Chromatog. Sci., **8**, 192 (1970).
38. *Crompton T.R., Cope B.*, Anal. Chem., **40**, 274 (1968).
39. Physics Exhibition, London 1967, Chemical Inspectorate of the Ministry of Defence exhibit.
40. *Sternberg J.C., Carson L.M.*, J. Chromatog., **2**, 53 (1959).
41. *Simon W., Clerc J.T., Dohner R.E.*, Helv. Chim. Acta, **48**, 1628 (1965).
42. *Simon W., Clerc J.T., Dohner R.E.*, Microchim. J., **10**, 495 (1966).
43. *Poulsen R.E., Jensen H.B.*, Anal. Chem., **40**, 1206 (1968).

Список дополнительной литературы

- Conlon R.D.*, Liquid chromatography detectors, Anal. Chem., **41**, (4), 107A (1969).
- Halasz I., Walkling P.*, J. Chromatog. Sci., **7**, 129 (1969). Различные типы заполненных колонок в жидкостной хроматографии.
- Horvath C., Lipsky S.R.*, Anal. Chem., **41**, 1227 (1969). Быстрый анализ рибонуклеозидов ... в пикомольных количествах в узких колонках с использованием стеклянных шариков, покрытых пленкой ионообменной смолы.

- Horvath C., Lipsky S.R.*, J. Chromatog. Sci., **7**, 109 (1969). Конструкция колонки в жидкостной хроматографии высокого давления.
- Huber J.F.K.*, Chromatog. Sci., **7**, 85 (1969). Высокоэффективная, высокоскоростная жидкостная хроматография в колонках.
- Hupe K.P., Bayer E.*, J. Gas Chromatog., **5**, 197 (1967). Микроадсорбционный детектор общего назначения в жидкостной хроматографии.
- Jentoft R.E., Gouw T.H.*, Anal. Chem., **40**, 1787 (1969). Жидкостная хроматография высокого разрешения.
- Maggs R.J.*, Column (Pye Unicam), **2**, (2, d) (1967). Использование пламенно-ионизационного детектора в качестве контрольного прибора для колонок в жидкостной хроматографии.
- Veening H.*, J. Chem. Ed., **47** (1970). Сентябрьский, октябрьский и ноябрьский номера содержат обзоры детекторов для ЖХ. Перечисленные выше статьи и обзоры служат примером работ в области высокоскоростной жидкостной хроматографии высокого разрешения, приведших к революции в методе жидкостной хроматографии.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ЕЕ МЕСТО СРЕДИ ДРУГИХ ВИДОВ ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматография достигла особенно интересной фазы своего развития в начале 1970 г. Еще 10 лет назад газовая хроматография занимала особое положение: ни один другой хроматографический метод не мог с ней конкурировать. Однако позднее стала развиваться хроматография в тонком слое и вслед за ней и гель-проникающая (ситовая) хроматография. Введение в обращение хроматографии со сверхкритической подвижной фазой и достижения, позволившие сделать качественный скачок в жидкостной хроматографии в колонках, расширили диапазон средств, доступных аналитику для целей разделения. В этой главе мы хотим сравнить различные методы, установить, в каких случаях возможно одновременное применение различных методов, и показать, какие критерии должны быть использованы при выборе того или иного метода. Мы остановимся также на вероятных улучшениях, которые могут повлиять на выбор метода в будущем.

Среди хроматографических методов, используемых в настоящее время, несомненно, наиболее разработанным является газовая хроматография. Использовать этот метод чрезвычайно просто, поскольку он хорошо оснащен инструментально, поэтому метод ГХ пытались применять для разделения и анализа очень широкого ряда материалов. Во многих случаях такие попытки оказались успешными; никаких непредвиденных осложнений не возникало, и результаты анализа были точными. Однако известны случаи, когда результаты анализа, проведенного методом газовой хроматографии, были менее точными. В частности, это наблюдалось при анализе сравнительно малолетучих веществ, например пестицидов и стероидов, а также относительно высоко реакционноспособных или химически и термически не стойких соединений. В таких случаях иногда пытаются перевести эти материалы в форму, более подходящую для эффективной и точной газовой хроматографии. Чтобы можно было хроматографировать летучие "осколки" нелетучих веществ (таких, как полимеры) и таким образом получать аналитическую информацию, недоступную другим путем, широко используют пиролиз. Для превращения полярных компонентов, которые могли бы в противном случае реагировать или адсорбироваться на колонке, в менее полярные производные используют этери-

фикацию и силилирование. Эти производные часто более летучи, чем исходные соединения, так что превращение выгодно в двух отношениях; например, представляется возможным хроматографировать силильные производные углеводов.

О разложении образцов в газовых хроматографах говорилось неоднократно. Вызывается оно обычно взаимодействием разделяемых веществ с материалами стенок колонок, твердым носителем и материалами доколоночных и послеколоночных коммуникаций при повышенных температурах. Образцы могут претерпевать деструкцию (например, насыщенные углеводороды превращаются в олефины в ГАХ на молекулярных ситах при температурах выше 350°C), частично или полностью адсорбироваться (например, серусодержащие соединения на трубках из меди или других металлов) или изомеризоваться (например, превращения терпенов).

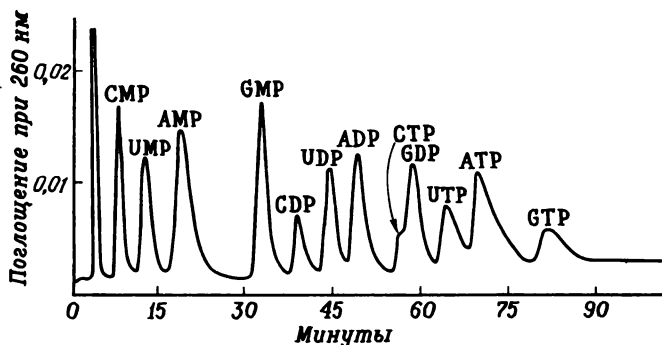
До совсем недавнего времени газовая хроматография по технике и инструментальному оформлению настолько опережала любой другой потенциально конкурирующий метод, что с описанными выше недостатками ГХ мирились, а во многих случаях их успешно преодолевали. Тем не менее с приходом новых альтернатив газовой хроматографии имеет смысл пересмотреть некоторые современные ее приложения. Например, превращение образцов в другие соединения до проведения ГХ может занимать много времени, поэтому, если какой-либо метод позволит избежать этого, то он может оказаться более приемлемым. Так, жидкостная хроматография, видимо, заменит газовую во многих важных разделениях относительно нелетучих соединений. В феврале 1969 г. по инициативе "Ciba Foundation" был созван симпозиум по использованию газовой хроматографии в биологии и медицине /1/. Мы считаем уместным привести высказывания присутствовавших на симпозиуме ведущих хроматографистов.

Липски: "Я убежден, что будущее за жидкостной хроматографией. Обычными станут системы, в которых можно будет анализировать пикомоли веществ. Используя такого рода методы, мы в конечном итоге сможем анализировать стероиды, включая половые гормоны".

Скотт: "Я согласен ... сейчас мы переживаем своего рода переходный период, когда жидкостная хроматография вытесняет газовую и многие исследователи все еще пытаются использовать технику ГХ там, где она практически неприменима. Еще два-три года назад мы не располагали методом, способным конкурировать с газовой хроматографией, сейчас положение изменилось. Использование ГХ при высоких температурах связано с необходимостью решения целого ряда таких сложных проблем, что уже только это ограничивает применимость ГХ в указанных условиях".

Это мнение большинства, но только большинства, а не всех ученых. Давайте посмотрим несколько работ, которые выполняются се-

годня методом жидкостной хроматографии. На рис. 8.1 показана жидкостная хроматограмма рибонуклеозидов моно-, ди- и трифосфорных кислот, полученная Хорватом и др. /2/ при использовании колонки размером 2 м x 1 мм, заполненной сильноосновной анионообменной смолой с частицами размером примерно 50 мкм при высоких давлениях, вплоть до 300 атм. Эта работа имеет несколько интересных особенностей. Во-первых, анализ длится всего -90 мин, в то время как при использовании прежних методов необходимо -20 ч, кроме того, прежний метод требует значительно больших образцов. Время анализа имеет такой же порядок величины, как и в случае

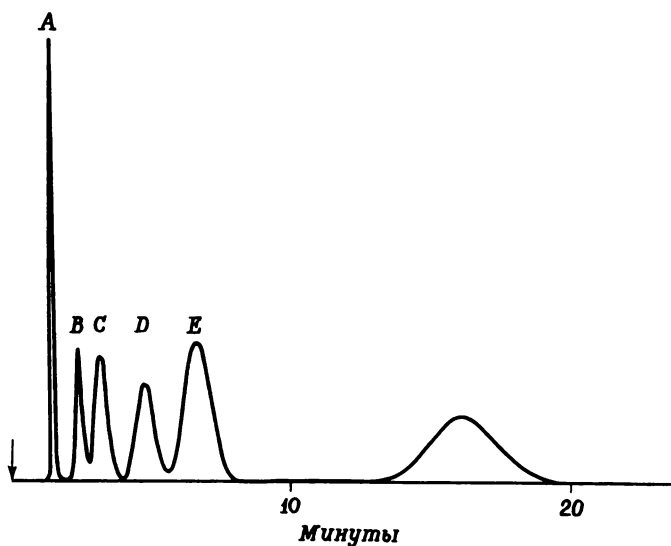


Р и с. 8.1. Разделение рибонуклеозидов моно-, ди-, и трифосфорных кислот.

сложных анализов в ГХ. Колонки можно использовать повторно; получают непрерывную запись разделения. Продукты гидролиза нуклеиновой кислоты, подобные показанным на хроматограмме, термически нестойки, однако в ЖХ это не вызывает осложнений. Наконец, это разделение (эффективность примерно 1 500 тарелок) не было и почти определенно никогда не будет получено с помощью хроматографии в тонком слое с соответствующей скоростью и точностью анализа. Эта работа показывает близкое сходство эксплуатационных и скоростных характеристик высокоэффективной жидкостной хроматографии в колонках и газовой хроматографии, а также превосходство первого метода над хроматографией в тонком слое.

Вернемся теперь к анализу стероидов; на его примере легко понять, почему ЖХ может заменить ГХ. Например, при физиологическом изучении беременности широко используют анализ стероидов мочи. Некоторые стероиды термически неустойчивы, а присутствие сильно полярных групп в молекулах затрудняет их разделение методом газовой хроматографии, поэтому часто приходится переводить анализируемые компоненты в другие соединения.

На рис. 8.2 показано разделение методом жидкостной хроматографии шести стероидов (без их предварительного превращения в другие соединения) примерно за 15 мин на колонке с эффективностью около 400 тарелок на 1 м [3]. Несмотря на то что с помощью высокоэффективной ЖХ в этой области выполнено пока небольшое количество работ, ясно, что этот метод уже может конкурировать с ГХ по скорости и разделительной способности; кроме того, при разделении методом ЖХ вещество не претерпевает изменений в процессе анализа, а это уже, вероятно, преимущество метода.

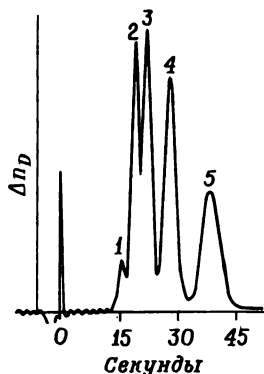


Р и с. 8.2. Разделение стероидов [3].

Другой областью, в которой ЖХ, по-видимому, может вытеснить ГХ, является разделение пестицидов. Объясняется это в основном теми же причинами, что и выше, особенно если учесть реакционную способность разделяемых материалов в очень горячих газовых колонках (высокие температуры необходимы для того, чтобы длительность разделения была приемлемой).

На рис. 8.3 показано разделение четырех обычных инсектицидов методом ЖХ на корасиле [4]. Длительность анализа примерно 45 с, а эффективность около 300 тарелок на 1 м. На рис. 8.4 показано разделение гербицидов методом жидкостной распределительной хроматографии на оксидипропионитриле, нанесенном на CSP (фирма "Du Pont") [5]. В этом случае длительность анализа составляет всего несколько минут и эффективность колонки равна 650 тарелок на 1 м.

Метод сверхкритической хроматографии разработан двумя датскими исследователями Си и Риендерсом [6, 7]; почти все опубликованные работы в этой области принадлежат им. Несмотря на ряд



Р и с. 8.3. Разделение инсектицидов методом высокоскоростной жидкостной хроматографии.
1 — примесь в альдрине; 2 — альдрин, 6 мкг/мл;
3 — *p, p'* DDT, 6 мкг/мл; 4 — DDD, 8 мкг/мл;
5 — линдан, 10 мкг/мл.

экспериментальных трудностей, присущих этому методу, его потенциальные возможности должны привлечь другие лаборатории в эту область.

Существенное различие между газовой и сверхкритической хроматографией состоит в том, что если в первом методе используется инертный газ при относительно низких давлениях (несколько атмосфер), то в сверхкритической хроматографии в качестве подвижной фа-

Таблица 8.1

Критические постоянные некоторых подвижных фаз		
	T_c , °C	P_c , атм
Двуокись углерода	31,1	73
<i>n</i> -Пентан	196,6	33,3
Изопропанол	235,3	47
Диэтиловый эфир	193,6	36,3

зы можно использовать различные материалы, являющиеся газами при температурах выше их критической точки. В табл. 8.1 указаны критические характеристики некоторых материалов, используемых в сверхкритическом состоянии в качестве подвижной фазы.

Сразу же можно заметить, что эти вещества охватывают широкий диапазон полярности. Следовательно, помимо изменения летучести и взаимодействия разделяемого вещества с неподвижной фазой, управляющих обычными газохроматографическими separations, здесь возможны самые различные изменения в селективности подвижной и неподвижной фаз. Фактически сверхкритическая хроматография имеет

много общего как с жидкостной, так и с газовой хроматографией.

Методика сверхкритической хроматографии еще только начинает развиваться и, естественно, разработана гораздо слабее, чем методика высокоэффективной ЖХ. Обычно в сверхкритической хроматографии требуются не только высокие давления, но и высокие температуры. Это усложняет проведение эксперимента и ограничивает применимость метода по отношению к нестойким материалам. Сверхкритическая хроматография намного отстает от газовой по инструментальному оформлению и простоте методики, и, вероятно, это всегда будет вызывать наибольшие затруднения в таких работах. Однако в некоторых важных отношениях сверхкритическая хроматография может все-таки превосходить ЖХ. Так, вязкость сверхкритических фаз намного меньше, чем у жидкости, поэтому намного проще достигнуть высоких скоростей потока через колонку, заполненную очень мелкими частицами (что необходимо для увеличения эффективности). Несмотря на сложность методики и аппаратного оснащения, сверхкритическая хроматография использовалась для многих разделений, и полученные результаты показали, что в некоторых отношениях она превосходит и ЖХ и ГХ. В табл. 8.2 перечислены специфические характеристики сверхкритической хроматографии.

Таблица 8.2

Характеристики сверхкритических разделений

Повышенная летучесть разделяемых веществ

Влияние подвижной фазы

Разделение не по размеру, а по типу соединений

Большой температурный эффект

Низкая вязкость подвижной фазы

Первые два фактора связаны между собой; взаимодействие подвижной фазы с разделяемым веществом ведет к его более быстрому вымыванию, чем в случае применения инертного газа и нормальных (т.е. газохроматографических) давлений. Например, время удерживания бензола и пентилбензола на колонке длиной 1 м, заполненной порпаком Q при 200°C, равно 7 и 150 мин соответственно, если газом-носителем служит гелий при давлении 2 атм (т.е. условия, обычные для ГХ), и 1 и 4 мин при использовании *n*-пентана под давлением 26 атм. Заметим, что та же самая колонка удерживает додецилоктадецилбензол (C₃₆) только 2 мин 40 с, если в качестве подвижной фазы используется пентан при давлении 42 атм.!

Рис. 8.4, взятый из работы [6], наглядно иллюстрирует возможность разделения по типам, а не по размерам соединений. В качестве неподвижной фазы в колонке использовался полиэтиленгликоль

6 000, в качестве сверхкритической подвижной фазы — *n*-пентан. На указанной хроматограмме ди-*n*-триконтилфталат элюировался даже раньше, чем намного меньший и более летучий дифенилфталат (селективность полиэтиленгликоля, равную 24 атомам углерода на бензольное кольца, можно сравнить с максимально достижимой селективностью ГЖХ, равной примерно 8 атомам углерода).

Нижние хроматограммы показывают, что гексилфталат элюируется раньше его циклогексилового аналога, который в свою очередь имеет удерживание, близкое к удерживанию алкилфталата C_{30} . Таким образом, хроматограммы приведенных модельных соединений показывают, что селективность разделения может соответствовать 10 и большему числу атомов углерода. Это позволяет делить фракции с широким интервалом температур кипения на типовые группы с пределами кипения, отличающимися на 200°C, что намного превосходит возможности ГХ и аналогично результатам, полученным в жидкостной хроматографии.

Рис. 8.5, также взятый из работы [6], показывает очень большое влияние температуры на относительные удерживания ди-*n*-алкилфталатов при температурах выше критической температуры элюента (*n*-пентана). Следует отметить, что по мере увеличения температуры от T_c до примерно 220°C абсолютное удерживание также возрастает;

в газовой хроматографии наблюдается противоположная зависимость.

Таким образом, используя сверхкритическую хроматографию, по-видимому, можно провести такие разделения, которые не удается осуществить методом ГХ. Со сверхкритической хроматографией конкурирует высокoeffективная жидкостная хроматография в колонках. Однако сейчас не представляется возможным провести объективное сравнение этих методов. В настоящее время ЖХ превосходит сверхкрити-

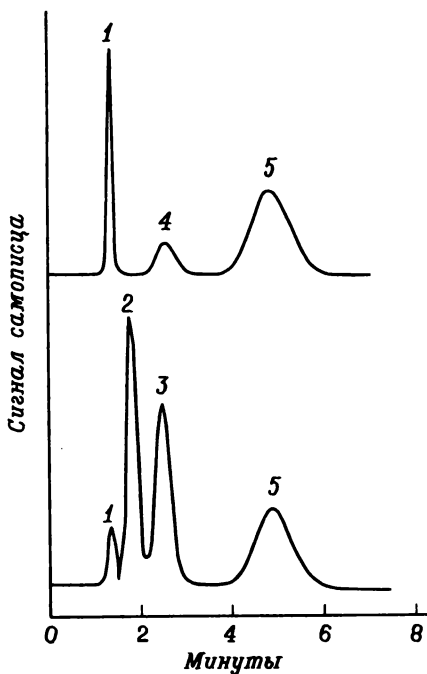


Рис. 8.4. Разделение фталевых эфиров методом сверхкритической хроматографии.

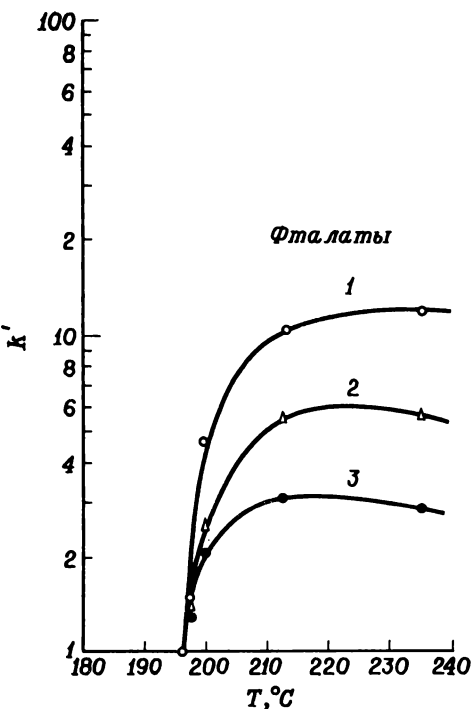
1 — бензол; 2 — ди-*n*- C_6 ; 3 — дицикло- C_6 ; 4 — ди-*n*- C_{30} ; 5 — дифталаты.

ческую хроматографию по аппаратному оформлению, особенно это касается детекторов. При работе со сверхкритическими подвижными фазами успешно использовались только спектрофотометрические и транспортно-ионизационные детекторы, поэтому разделению подвергались в основном ароматические соединения. Однако положение, по-

видимому, скоро изменится, поскольку, как правило, больше внимания уделяют развитию более новых методов. Неоспоримым преимуществом ЖХ является применимость метода для разделения высокомолекулярных веществ, включая высокополимерные соединения.

Таким образом у ЖХ, по-видимому, нет конкурентов с точки зрения широты охвата классов исследуемых соединений, относительной мягкости условий разделения (особенно температуры) и простоты и надежности аппаратного оформления. Однако очень быстрые анализы, продемонстрированные с помощью других методов, делают ЖХ наиболее пригодной для разделения тех материалов, которые не удается разделить с помощью ГХ.

Наконец, следует сравнить жидкостную хроматографию в колонках и в тонких слоях. В какой-то степени это уже было сделано ран-



Р и с. 8.5. Влияние температуры на удерживание в сверхкритической хроматографии.

1 - ди-н-С₈; 2 - ди-н-С₄; 3 - ди-н-С₂.

ше при сравнении скорости образования теоретических тарелок*, которое показало, что при применении хроматографии в колонках скорость образования теоретических тарелок по меньшей мере на 1-2 порядка выше, чем в хроматографии в тонком слое. Тонкие слои де-

*Под скоростью образования теоретических тарелок автор понимает число теоретических тарелок, реализуемое в единицу времени. - Прим. перев.

шевы, их легко использовать, они довольно эффективны, длительность анализа в этом случае достаточно мала, тогда как колонки могут быть дорогими и довольно сложными. Однако скорость образования теоретических тарелок в колонках велика, и колонки очень эффективны, поэтому их следует использовать для аналитических целей в тех случаях, когда необходимы высокое разрешение ($> 5 \cdot 10^2$ тарелок), быстрые анализы (< 10 мин) или точные количественные измерения.

В заключение укажем, что газовая хроматография и хроматография в тонком слое остаются наиболее общими полезными методами аналитического контроля. Но важность хроматографии в колонках будет возрастать, поскольку этот метод пригоден для точного автоматического анализа при высоком разрешении.

Список литературы

1. Porter R (ed.), Gas Chromatography in Biology and Medicine, J. and A. Churchill, London, 1969, p. 154.
2. Horvath C.G., Preiss B.A., Lipsky S.R., Anal. Chem., **39**, 1422 (1967).
3. Hulsman J.A.R.J., Thesis, Univ. Amsterdam (1969).
4. Chromatography Notes (Waters Associates, Inc. Framingham, Mass.), **1** (1), 4 (1970).
5. Kirkland J.J., J. Chromatog. Sci., **7**, 7 (1969).
6. Sie S.T., Rijnders G.W.A., Anal. Chim. Acta., **38**, 31 (1967).
7. Sie S.T., Rijnders G.W.A., Gas Chromatography 1968, Harbourn, C.L.A., ed., Inst. Pet., London, 1969, p. 235.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Автораддиография 176
Адсорбенты 52, 59
 активация 82
 активность 58,66,154
 — метод проверки 66,67
 активные 56
 выбор 55,56
 выпускаемые промышленностью 57
 дезактивация 62,63,65,66,77,99
 дезактивированные 70,75
 емкость 73,81
 — линейная 60,61,63,64,75,77
 — — увеличение 62
 загрязнения 178,179
 инертные 62
 кислотные 84, 86, 87
 модифицированные 57,79,80,152
 — пропитыванием 57
 неполярные 58
 основные 56, 84, 85
 природа поверхности 81,82
 реактивация 63
 стандартизация 56,59,65 — 67,135, 152
 типы 58
 углеродный 81 и сл.
 удельная поверхность 56,58,59,73, 78,79,81,86
 хранение 179
 чистота 178,179
Адсорбция 37,52
 влияние среды 52
 изотерма 52,53
 — выпуклая 59
 — нелинейная 61,62
 — тип *C* (линейная) 53,59
 — — *H* 53
 — — *L* (Ленгмюра) 53,59
 — — *S* 52,53,59
 селективная 52
 физическая 54,87
 химическая (хемосорбция) 55,87
 энергия 54, 55, 65, 68, 71, 77
Активность
 вещества в контактирующих фазах 91
 коэффициент 92,95
 — членов гомологического ряда 92
Амберлит 86,87
Анализ
 атмосферных загрязнений 183
 время 80,101,102,242
 — в высокоскоростной хроматографии 81,242
 — зависимость от температуры 103
Аппаратура, влияние на разделение 51
Арматура в ЖХ в колонке 203,204
Биоглас 122
ван Деелтера уравнение 28,29
Вискозиметрия 127
Высокомолекулярные соединения 125 и сл.
 определение молекулярновесового распределения 126 — 128
 разделение 125
Высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ) 18 — 20,29, 33,43,50,243
вклад вихревой диффузии 43,110, 111
 — внеколоночный 45
 — диффузии в неподвижной фазе 29,34 — 36
 — массопередачи 39,40
в итовой хроматографии 119
вычисление 19,20

- для колонки 19, 20, 27, 28
- для ТСХ 20
- по уравнению *ван Деемтера* 28, 29
- в эффективной ЖХ в колонке 36
- зависимость от коэффициента распределения 28, 29
- от размера частиц неподвижной фазы 47, 48
- от скорости подвижной фазы 28, 29, 38, 80
- от толщины неподвижной жидкой пленки 28, 29
- приведенная 106
- Вязкость**
 - зависимость от молекулярного веса 125
 - раствора полимера 125
 - удельная 125
 - уравнение *Эйнштейна* 125
 - характеристическая 125
- Гели**
 - набухание 112, 119
 - поливинилацетатные 123
 - стиролдивинилбензолные 123 — 125
- Градиентное элюирование** 49, 51, 133, 150, 199 и сл.
- Графит** 82 — 84
- Графон** 82 — 84
- Гидравлическая система** 189, 190
 - с насосом 192
 - сжатым газом 190
 - — недостатки 192
- Давление** 80
 - осмотическое в гелях 112
- Двуокись кремния** (см. *силикагель*) 55, 57, 58, 71, 73 и сл.
- Декстраны** сшитые 122
- Демпфирование пульсаций потока** 190, 196 — 198
 - метод 196 — 198
 - аккумулятор гидродинамический 198
 - — поршневого типа 196
 - трубка Бурдона 196
- Денситометрия** 135, 170
 - в отраженном свете 174
 - приборы 172
 - точность 172, 174, 175
- Десорбция** 37
- Детектирование** 157
 - метод 69
 - выбор 56
- Детекторы** 17, 208 и сл.
 - для ЖХ в колонке 208 и сл.
 - пламенно-ионизационный 226, 227
 - по плотности 232
 - полярографический 229, 230
 - по радиоактивности 227, 228
 - рефрактометрические 212 — 215
 - по теплоте адсорбции 215 — 219
 - адиабатический вариант 218
 - спектрофотометрические 219 — 221
 - в сверхкритической хроматографии 247
 - универсальные 209, 214
- Диффузия**
 - вихревая 31, 40, 41, 43
 - вклад в ВЭТТ 43, 110, 111
 - молекулярная 33
 - в подвижной фазе 35, 36, 101, 102
 - — вклад в ВЭТТ 29, 35, 36
 - коэффициент 29, 33 и сл., 111
 - поверхностная 33, 34
 - продольная 29, 35
 - скорость в жидкую фазу 90, 91, 101, 102
 - через пленку в неподвижной фазе 39
- Дурапак** 100
- Жидкости** несмешивающиеся 90
- Зипакс** 80, 100
- Зона хроматографическая** 15 — 17, 24
 - размывание 24 — 26, 30
 - вклад диффузии 27
 - — вклад массопередачи 27
- Идентификация** 22, 23, 65, 135, 136, 142, 152, 177, 181
- ИК-спектроскопия** 184
- Индикатор флуоресцентный** 135
- Испаритель подвижной фазы** 223
- Камеры для проявления хроматограмм** 145
 - бак 145 — 148
 - BN-камера 149
 - C-камера 148, 154, 155
- Кизельгур** 58
- Коллекторы фракций** 207
- Колонки** 17, 18
 - арматура 203 и сл.
 - высокоэффективные 30, 124, 133
 - готовые 56

- диаметр 49,51,203
длина 49,51,203
заполнение 80,203,204
– методы 203
калибровка в ситовой хроматографии 120
металлические 203
нагрузка по жидкой фазе 106,107
объем общий растворителя 108
– свободный 108
проницаемость 203
сравнение с пластинками 46
стеклянные 203
- Концентрация
равновесная 52
распределение 16
- Корасил 81
- Кран-дозатор 201 и сл.
- Коэффициент
адсорбционный 59,71,134
– линейный 59
– связь со структурой вещества 71
– – с удельной поверхностью и по-
верхностной энергией 65
диффузии, см. Диффузии коэффи-
циент
извилистости 42
- Линейная емкость 59,61 – 63,75,77
- Магнезия, см. Окись магнезия
- Манометр 198
- Марка – Хувинка уравнение 125
- Массопередача 29,36,37,50
вклад в ВЭТТ 39,40,110
– в ситовой хроматографии 110
скорость 31
уравнение 39
- Масс-спектрометрия 184
- Мельницы 206
- Меркогель 123
- Молекулярные сита 57
- Молекулярный вес
на единицу длины цепи 127
средневесовой 126
средневязкостный 126
среднечисловой 126
- Насосы 17
с возвратно-поступательным дви-
жением 193
диафрагменный 190, 193
с несколькими головками 196
перистальтический 193
плунжерный 190,193
с постоянно толкающим поршнем 195
ротационный 194
– дифференциальная схема вклю-
чения 195
сильфонный 125
- Нингидрин, использование в фотомет-
рическом детекторе 221
- Носители 104 – 106
выбор для ЖРХ 104
дезактивация 99
инертные 14,58
поверхностно-пористые 80
размер частиц 104
с контролируемой поверхностной
пористостью 80,105
- Образец (проба) 17,18
ввод в колонку 200 и сл.
– шприцем 200,201
– краном-дозатором 201,202
выделение 181
загрязнение 177,184
методика обращения 180 – 182
нанесение на пластинку 142 – 145
размер 56,59,60,107,156
сложность 156
- Окись алюминия 53,55,58,71,76 – 79
адсорбционные центры 78
кристаллические формы 77
- Окись магнезия 55,57,58,62,68,79
- Объем
гидродинамический 126
колонки свободный 108
мертвый 21
– арматуры 204
неподвижной фазы в слое 21
растворителя в колонке 108
удерживания 21,94
элюирования 108,115,126
– связь с молекулярным весом в
ситовой хроматографии 123 – 127
- Пики 183
размывание, см. Размывание по-
лосы
форма 59 – 61, 110
ширина 20
- Пластинки для ТСХ 133
высушивание и хранение 138
готовые 57,139,168, 169
дезактивация 142
наклон при проявлении 156
приготовление 136 и сл.
стандартизация активности 142
хроматографические свойства 140

- Порасил 121
- Поры в адсорбенте
диаметр 58,59,73,78,80,83,84,86
распределение по размерам 73,
111, 155
- Предел ситового исключения 115, 122,
123
- Пятно в ТСХ
детектирование 157 – 160
диаметр 143
площадь 169,170
– зависимость от веса образца 170
обнаружение 156 и сл.
– в УФ-лучах 156
форма 60,132
центр 143
- Разделение 11,13,14,24 – 27,65,84
коэффициент 21,25
скорость 11
степень 102
- Разделяющая способность 18,20,25
- Размывание
зоны 25
пика 128
полосы 24,34,37,46
– при вводе образца 205
– вклады различных процессов 44
– внеколоночное 45,211,232
– в неподвижной фазе 35
– в подвижной фазе 34
- Разрешающая способность 50
- Распределение 14,28,90,92
коэффициент 21,22,29,45,91,92,108,
109
– зависимость от свойств раствора
91,92
– в ситовой хроматографии 108
термодинамика 91,92
- Растворенное вещество
загрязнение 177
неполное извлечение из слоя 177,
178
- Растворители
вязкость 35,36
обезгаживание 198
замена, влияние на диффузию 36
природа фронта 155
влияние на воспроизводимость
в ТСХ 155,156
расслаивание 69,70,151
требования 179
чистота 179
- Раствор полимера, вязкость 125
- Реагенты для обнаружения пятен в
ТСХ 157 и сл.
общие 158 – 159
специфические 158,160 и сл.
- Рефрактометр дифференциальный 212
принципиальная схема 212,213
- Сажа 82
графитированная 58
- Свидетель в ТСХ 90,91
- Связующее в ТСХ 135,136,141
- Селективность 14,20,92,94,95,133
адсорбента 58,73,75,76
в сверхкритической хроматографии
246
оценка 96,98
пары фаз 91
связь с критической температурой
растворения 95,96
– выбор 91
смолы 87
- Сефадексы 122
- Силикагель 57,59,62,73 – 77,136
- Силикат магния 58,79
- Система распределения
идеальная 99
хроматографическая 101,102
– динамические свойства 101 и сл.
- Скорость
адсорбции 26,27
движения компонентов 13,134
десорбции 26
массопередачи 26,27
подвижной фазы 26,27,190,194
– влияние на эффективность ко-
лонки в ЖРХ 105
– оптимальная 27,80,156
образования теоретических тарел-
лок 247,248
- Слой адсорбента 17,18,24,30
вымывание вещества 167,177 и сл.
градиентный в ТСХ 139
нанесение на пластину 137 и сл.
толщина в ТСХ 65,136,144,154
- Смолы
анионообменные 242
ионообменные 80,84 и сл.
катионообменные 84
макросетчатые 85,87
- Сопротивление органических жидкос-
тей 228
- Сорбция 16
- Спектрофотометр, использование
для детектирования 219

- Спектрофотометрия 135,175
по методу отражения 175
Стабильность двухфазной системы 99
Сульфат кальция 57
Сферон 81 – 83
Тальк 57
Теория
ситовой хроматографии 112 – 114
– равновесная 114
"случайного шага" 29 – 32,110
тарелок 19,27
Температура 50
влияние на время анализа 104
в ТСХ 152,155
колонок 205
критическая растворения 95,96
программирование в ЖХ 206
Транспортеры, типы 223 – 224
– очистка 224,227
Уголь активный 82,84
ионообменные свойства 83
Удерживание 21,23
величина 20,22,61
время 20
объем 21
– связь с коэффициентом распределения 92
параметры 21,22
– в ТСХ 22,146
– – воспроизводимость 147,152
– – вычисление 134
– – при многократном проявлении 149
– измерение 22,67
– – зависимость от типа камеры для проявления 148
– – факторы, влияющие на 152
Уравнение
ван Деемтера 28
Марка – Хувинка 125
Эйнштейна 33,125
Фаза жидкая 14
Фазовые диаграммы 99
использование для подбора селективности 99
Фазы
неподвижные 13,14,17,30,36,47,52,108,115
– жидкие 36,80
– – модифицирование 133
– – приготовление 106
– – термическая стабильность 115
– – приготовление 106
– – химически связанные 100,106,107
– в ЖРХ 22,93
– в ТСХ 135 – 136
подвижные 13,14,17,18,30,35,36,48 и сл., 52,56,67,101,102,155
– жидкие 13
– – в ЖРХ 30,92
– – в ТСХ 143 и сл., 156
– сверхкритические 13
Флорисил 55,67,71,78,
Флуоресценция как метод идентификации 183
Флуориметрия как метод идентификации 175
Фракционирование адсорбентов 206 и сл.
Хемосорбция 55,58,74,79
Хроматограмма
воспроизводимость в ТСХ 148
запись 167
методы получения 17
– проявления 15
– – в ТСХ 145 и сл.
выявление (обнаружение) в ТСХ 15
опрыскивание 15,134,157
Хроматограф колоночный (схема) 17
Хроматографическая система, выбор в адсорбционной хроматографии 56,71
Хроматографическое разделение 54
Хроматография
адсорбционная 12,13,33,34,36,37,39 и сл.
– жидкостная 52
– – адсорбенты 56,57,65 – 67, 73 и сл.
– – – линейная емкость 61,62
– – – стандартизация 65 – 67
– – – адсорбционный коэффициент 59 – 61,63,65,71
– – – выбор подвижной фазы 67 и сл.
– – – выбор системы 55
вытеснительная 16,17
в колонке 17,49
– высокоэффективная 152,183,185,186,194,201,208,227,242
– – примеры разделений 242,243
– – распределительная 107

- в тонком слое 11, 17, 46, 66, 69, 73, 132 и сл.
- методика 133, 156
- – количественный анализ 134, 167 и сл., 177
- – – на слое 167 и сл.
- – стандартизация 152, 156
- метод проявления 145 и сл.
- – в атмосфере ненасыщенных паров 151
- – восходящий 18, 145
- – горизонтальный 18, 149
- – градиентный 150, 152
- – двумерный 150
- – круговой 148
- – многозональный 151
- – многократный 149
- – непрерывный 149
- – нисходящий 18, 148
- – с программированием паровой фазы 151
- – ступенчатый 150
- метод сравнения 169
- – визуальный 169
- – денситометрический 170
- – по площади пятен 169, 170
- – радиометрический 176, 177
- флуориметрический 175
- – современное состояние и перспективы 18
- – сравнение с хроматографией в колонках 247, 248
- газовая 11, 20, 43, 183, 240
- сравнение с ЖХ
- гель-проникающая, см. Ситовая
- гель-фильтрационная, см. Ситовая
- жидкостная 11, 12, 20, 24, 25, 43, 50, 52
- сравнение с ГХ 43, 50, 241 – 242, 246, 247
- – со сверхкритической хроматографией 246, 247
- ионообменная 14
- на бумаге 11, 17, 132
- распределительная 90 и сл.
- выбор пары подвижной и неподвижной фаз 91, 92, 101
- коэффициент распределения 91 – 92
- неподвижная фаза 99 – 100, 104, 106
- носители 104 – 106
- селективность 91, 92, 94, 95
- удерживание 94
- сверхкритическая 13, 177, 240, 244 – 247
- детекторы 247
- ситовая 12, 14, 33, 40, 108 и сл.
- выбор растворителя 125
- применение
- – к высокомолекулярным соединениям 125 и сл.
- – – низкомолекулярным 129, 130
- – размывание пика 129
- элютивная 55
- Шарики стеклянные 80
- Шприцы 189, 201
- для ввода образца (пробы) 200, 201
- Эйнштейна* уравнение 33, 125
- Элюат 13
- методы нанесения на транспортер 223
- Элюент 13
- выбор 68
- вязкость 102, 103
- скорость 46
- Элюирование 15, 24
- градиентное, см. Градиентное элюирование
- Элюирующая сила 68
- Элюотропный ряд 68, 69, 83
- Экстракция 91
- Эффективность 38, 39
- жидкостной хроматографии в колонке 242
- колонки 44, 123, 124
- разделения 46
- связь с удерживанием 38, 39

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	5
Предисловие авторов	7
Предисловие к американскому изданию	9
Глава 1. Жидкостная хроматография. Основные положения	11
1.1. ВВЕДЕНИЕ	11
1.2. ПЛАН КНИГИ	11
1.3. ОСНОВНЫЕ ВИДЫ ХРОМАТОГРАФИИ	13
1.3.1. Адсорбционная хроматография	13
1.3.2. Ионообменная хроматография	14
1.3.3. Распределительная хроматография	14
1.3.4. Ситовая хроматография	14
1.4. МЕТОДЫ ПРОЯВЛЕНИЯ ХРОМАТОГРАММ	15
1.4.1. Элюирование	15
1.4.2. Фронтальный анализ	16
1.4.3. Вытеснение	16
1.5. АППАРАТУРНЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ХРОМАТОГРАММ . . .	17
1.5.1. Хроматография в колонке	17
1.5.2. Хроматография в слое	18
1.6. КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ РАЗДЕ-	
ЛЕНИЙ	18
1.6.1. ВЭТТ	18
1.6.2. Разделительная способность	20
1.7. ПАРАМЕТРЫ УДЕРЖИВАНИЯ	21
1.7.1. Критерии удерживания	21
1.7.2. Удерживание и идентификация	22
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	23
Глава 2. Размывание хроматографических зон	24
2.1. ВВЕДЕНИЕ	24
2.2. ФАКТОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ РАЗМЫВАНИЕ ЗОН	25
2.3. КОНЦЕПЦИЯ "СЛУЧАЙНОГО ШАГА"	30
2.4. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КОНЦЕПЦИИ "СЛУЧАЙНОГО	
ШАГА"	32

2.5. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИФфуЗИЯ	33
2.6. МАССОПЕРЕДАЧА	36
2.7. ВИХРЕВАЯ ДИФфуЗИЯ	40
2.8. ОКОНЧАТЕЛЬНОЕ ВЫРАЖЕНИЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫСОТЫ ТАРЕЛКИ	43
2.9. ВНЕКОЛОНОЧНЫЕ ВКЛАДЫ В РАЗМЫВАНИЕ ПОЛОСЫ	45
2.10. СРАВНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КОЛОНОК И ПЛАСТИН	46
2.11. ПРАКТИЧЕСКИЕ ВЫВОДЫ	46
2.11.1. Выбор неподвижной фазы	47
2.11.2. Размер частиц неподвижной фазы	47
2.11.3. Размеры слоя неподвижной фазы	48
2.11.4. Выбор подвижной фазы	49
2.11.5. Скорость подвижной фазы	50
2.11.6. Температура	50
2.11.7. Аппаратура	51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	51
Глава 3. Адсорбционная хроматография. Механизм процесса и исполь- зуемые материалы	52
3.1. ВВЕДЕНИЕ	52
3.2. ИЗОТЕРМЫ АДсорбЦИИ	52
3.3. ПРИРОДА АДсорбЦИОННЫХ СИЛ	54
3.3.1. Вандерваальсовы силы (лондоновские дисперсионные си- лы)	54
3.3.2. Индукционные силы	54
3.3.3. Водородная связь	55
3.3.4. Перенос заряда	55
3.3.5. Ковалентная связь (хемосорбция)	55
3.4. ВЫБОР ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В АДсорбЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	56
3.4.1. Выбор адсорбента	56
а. ОБЩИЕ СВОЙСТВА АДсорбЕНТОВ	56
б. ТИП АДсорбЕНТА	58
в. ВЕЛИЧИНА УДЕЛЬНОЙ ПОВЕРХНОСТИ И ДИАМЕТР ПОР.	59
3.4.2. Размер образца и линейная емкость	59
а. РАЗМЕР ОБРАЗЦА И ФОРМА ПОЛОСЫ	59
б. ЛИНЕЙНОСТЬ ИЗОТЕРМЫ	61
в. ЛИНЕЙНАЯ ЕМКОСТЬ	61
г. ПРИЧИНЫ НЕЛИНЕЙНОСТИ ИЗОТЕРМЫ.	61
д. УВЕЛИЧЕНИЕ ЛИНЕЙНОЙ ЕМКОСТИ	62
е. ЛИНЕЙНЫЕ ЕМКОСТИ В КОЛОНКАХ И ТОНКИХ СЛОЯХ	64
3.4.3. Стандартизация адсорбента	65
3.4.4. Выбор подвижной фазы	67

3.5. ЗАВИСИМОСТЬ АДСОРБЦИОННОГО КОЭФФИЦИЕНТА K^0 ОТ СТРУКТУРЫ РАСТВОРЕННОГО ВЕЩЕСТВА.	71
3.6. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ АДСОРБЕНТЫ	72
3.6.1. Силикагель	72
3.6.2. Окись алюминия	76
3.6.3. Силикаты магния	78
3.6.4. Окись магния	79
3.6.5. Модифицированные адсорбенты	79
3.6.6. Поверхностно-пористые носители	80
3.6.7. Углеродные адсорбенты	81
3.6.8. Ионообменные смолы	84
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	87
Глава 4. Жидкостная распределительная хроматография Механизм процесса и используемые материалы	90
4.1. ВВЕДЕНИЕ	90
4.2. ТЕРМОДИНАМИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕЩЕСТВА МЕЖДУ ДВУМЯ ЖИДКИМИ ФАЗАМИ	91
4.2.1. Зависимость коэффициента распределения от свойств раствора	91
4.3. ВЫБОР ПОДХОДЯЩЕЙ ПАРЫ ПОДВИЖНОЙ И НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗ	92
4.3.1. Селективность	92
4.3.2. Стабильность двухфазной системы	99
4.3.3. Зависимость динамических свойств системы от выбора системы фаз	101
4.4. НОСИТЕЛИ	104
4.5. НЕКОТОРЫЕ ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	106
4.5.1. Приготовление неподвижных фаз	106
4.5.2. "Нагрузка" по жидкой фазе и величина образца	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107
Глава 5. Ситовая хроматография. Механизм процесса и используемые материалы	108
5.1. ВВЕДЕНИЕ.	108
5.2. РАЗМЫВАНИЕ ПИКОВ В СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	110
5.3. ТЕОРИЯ СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	113
5.4. НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	114
5.4.1. Неорганические неподвижные фазы	120
5.4.2. Алкилированные шитые декстраны	122
5.4.3. Поливинилацетатные гели	123
5.4.4. Полистирол-дивинилбензолные гели	123
ПРИЛОЖЕНИЕ. ПРИМЕНЕНИЕ СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	125
1. Высокомолекулярные соединения	125

2. Низкомолекулярные соединения	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130
Глава 6. Хроматография в тонком слое	132
6.1. ВВЕДЕНИЕ	132
6.2. ОСНОВЫ МЕТОДА	133
6.3. НЕПОДВИЖНАЯ ФАЗА	135
6.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПЛАСТИН ДЛЯ ТСХ	136
6.4.1. Выбор подложки	136
6.4.2. Приготовление суспензии	137
6.4.3. Нанесение слоя на пластины	137
6.4.4. Высушивание и хранение пластин	138
6.4.5. Пластины с готовым слоем	139
6.4.6. Выводы	141
6.5. НАНЕСЕНИЕ ОБРАЗЦА	142
6.5.1. Аналитический метод	142
6.5.2. Препаративный метод	144
6.6. ВЫБОР ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ	145
6.7. ПРОЯВЛЕНИЕ ХРОМАТОГРАММ	145
6.7.1. Проявление в баке	147
6.7.2. С-камеры	148
6.7.3. Другие методы проявления	148
6.8. ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ ЗНАЧЕНИЙ	152
6.8.1. Введение	152
6.8.2. Факторы, влияющие на воспроизводимость	152
6.8.3. Выводы	156
6.9. ДЕТЕКТИРОВАНИЕ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ	157
6.9.1. Осмотр пластинки в ультрафиолетовом свете	157
6.9.2. Обнаруживающие реагенты	157
Реагенты общего назначения	158
Специфические реагенты	160
6.10. ЗАПИСЬ ХРОМАТОГРАММ	167
6.11. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ НЕПОСРЕДСТВЕННО НА СЛОЕ	
6.11.1. Введение	167
6.11.2. Визуальное сравнение	169
6.11.3. Измерение площади	169
6.11.4. Метод денситометрии	170
6.11.5. Метод флуориметрии	175
6.11.6. Спектрофотометрические измерения по методу отражения	175
6.11.7. Методы измерения по радиоактивности	176
6.12. ИЗВЛЕЧЕНИЕ РАЗДЕЛЕННОГО ВЕЩЕСТВА ИЗ СЛОЯ АДСОРБЕНТА	177

6.12.1. Введение	177
6.12.2. Чистота адсорбента	178
6.12.3. Требования, предъявляемые к растворителю	179
6.12.4. Методика обращения с образцом	180
6.13. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ МЕТОДОВ	182
6.13.1. Спектрофотометрия	182
6.13.2. Флуоресценция в УФ-области	183
6.13.3. Другие хроматографические методики	183
6.13.4. Инфракрасная спектроскопия и масс-спектрометрия	184
6.13.5. Детектирование с помощью пламенно-ионизационного детектора	185
6.14. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ	185
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	186
Глава 7. Оборудование для хроматографии в колонке	189
7.1. ВВЕДЕНИЕ	189
7.2. ГИДРАВЛИЧЕСКАЯ СИСТЕМА	190
7.2.1. Использование сжатых газов	190
7.2.2. Насосы	192
7.2.3. Перистальтические насосы	193
7.2.4. Насосы с возвратно-поступательным движением	193
7.2.5. Ротационные насосы	194
7.2.6. Насосы с постоянно толкающим поршнем	195
7.2.7. Методы демпфирования пульсирующих потоков	196
7.2.8. Обезгаживание растворителя	198
7.3. МАНОМЕТРЫ	198
7.4. УСТРОЙСТВА ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ГРАДИЕНТНОГО ЭЛЮИРОВА- НИЯ	199
7.5. УСТРОЙСТВА ДЛЯ ВВОДА ПРОБЫ	200
7.6. КОЛОНКИ И АРМАТУРА	203
7.7. МЕЛЬНИЦЫ И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ	206
7.8. КОЛЛЕКТОРЫ	207
7.9. ДЕТЕКТОРЫ	208
7.9.1. Введение	208
7.9.2. Детектирующие системы, выпускаемые промышленно- стью	212
а. РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЕ ДЕТЕКТОРЫ	212
б. ДЕТЕКТОРЫ ПО ТЕПЛОТЕ АДсорбции	215
в. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ ДЕТЕКТОРЫ	219
г. ТРАНСПОРТНО-ИОНИЗАЦИОННЫЕ ДЕТЕКТОРЫ	221
д. ДЕТЕКТОРЫ ПО РАДИОАКТИВНОСТИ	227
е. ДЕТЕКТОРЫ ПО ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТИ	228
7.9.3. Экспериментальные системы детектирования	229
а. ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЕ ДЕТЕКТОРЫ	229

б. ДЕТЕКТОР ПО ТЕПЛОТЕ РЕАКЦИИ	231
в. ДЕТЕКТОРЫ ПО ПЛОТНОСТИ	232
г. ДЕТЕКТОРЫ ПО ДИЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ . .	232
д. ДЕТЕКТОРЫ ПО УПРУГОСТИ ПАРА	233
ПРИЛОЖЕНИЕ Краткий справочник по оборудованию для жидкостной хроматографии в колонках	235
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	237
Глава 8. Современное состояние жидкостной хроматографии и ее место среди других видов хроматографии	240
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	248
ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ	249

С. Перри, Р. Амос, П. Брюер.
ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО
ПО ЖИДКОСТНОЙ ХРОМОСТОГРАФИИ

Редактор Р.И. Краснова

Художник К.И. Милаев

Художественный редактор Н.Г. Блинов

Технический редактор Н.И. Борисова

Подписано к печати 8/V 1974 г. Бумага офсетн. № 1 60 x 90¹/₁₆ = 8,13 бум. л.

Уч.-изд. л. 16,14 Изд. № 3/7313 цена 1р. 16к. Зак. 467

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва, 1-й Рижский пер., 2

Тульская типография «Союзполиграфпрома»
при Государственном комитете Совета Министров СССР
по делам издательств, полиграфии и книжной торговли,
г. Тула, проспект им. В. И. Ленина, 109.

