

ВЫСШЕЕ ОБРАЗОВАНИЕ

серия основана в 1996 г.



**А.И. ЖЕБЕНТЯЕВ**

# **АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА**

*Допущено  
Министерством образования Республики Беларусь  
в качестве учебного пособия для студентов  
учреждений высшего образования  
по специальности «Фармация»  
и химическим специальностям*

Минск  
«Новое знание»

Москва  
«ИНФРА-М»

2013

УДК 543.544(075.8)

ББК 24.4я73

Ж44

Рецензенты:

кафедра общей химии Белорусского государственного медицинского университета;

доцент кафедры аналитической химии Белорусского государственного университета, кандидат химических наук, доцент *В.А. Винарский*

**Жебентяев, А.И.**

**Ж44** Аналитическая химия. Хроматографические методы анализа : учеб. пособие / А.И. Жебентяев. — Минск : Новое знание ; М. : ИНФРА-М, 2013. — 206 с. : ил. — (Высшее образование).

ISBN 978-985-475-553-3 (Новое знание)

ISBN 978-5-16-006615-8 (ИНФРА-М)

На современном научном уровне изложены основные понятия и термины, используемые в хроматографических методах. Рассмотрены наиболее широко используемые хроматографические методы в соответствии с общепринятой классификацией, отмечены их достоинства и недостатки.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по фармацевтическим и химическим специальностям.

**УДК 543.544(075.8)**

**ББК 24.4я73**

ISBN 978-985-475-553-3 (Новое знание)

ISBN 978-5-16-006615-8 (ИНФРА-М)

© Жебентяев А.И., 2013

© ООО «Новое знание», 2013

# Оглавление

<i>Предисловие</i> .....	6
<i>Список основных сокращений и условных обозначений</i> .....	8
<b>Введение</b> .....	9
<b>Глава 1. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ</b> .....	13
1.1. Классификация хроматографических методов .....	13
1.2. Хроматографические параметры .....	16
1.3. Теории хроматографического разделения .....	21
<b>Глава 2. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ</b> .....	27
2.1. Общая характеристика .....	27
2.2. Системы ввода пробы .....	29
2.3. Хроматографические колонки .....	32
2.4. Адсорбенты .....	34
2.5. Твердые носители в газо-жидкостной хроматографии .....	39
2.6. Неподвижные жидкие фазы .....	41
2.7. Подвижные фазы .....	45
2.8. Детекторные системы .....	46
2.9. Качественный анализ .....	54
2.10. Количественный анализ .....	59
<b>Глава 3. ЖИДКОСТНАЯ КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ</b> .....	62
3.1. Общая характеристика .....	62
3.2. Жидкостная адсорбционная хроматография .....	66
3.2.1. Варианты жидкостной адсорбционной хроматографии .....	66
3.2.2. Жидкостный хроматограф .....	72
3.2.3. Колонки .....	73
3.2.4. Адсорбенты .....	74
3.2.5. Подвижные фазы .....	78
3.2.6. Детекторы .....	85
3.3. Распределительная жидкостная хроматография .....	88
3.3.1. Неподвижные фазы и носители .....	89
3.3.2. Подвижные фазы .....	90
3.4. Ионообменная хроматография .....	94
3.4.1. Иониты .....	94
3.4.2. Классификация ионообменных смол .....	99
3.4.3. Подвижные фазы .....	102
3.5. Ионная хроматография .....	103
3.6. Ион-парная хроматография .....	105
3.7. Лигандообменная хроматография .....	106

3.8. Эксклюзионная хроматография.....	107
3.9. Аффинная хроматография .....	112
<b>Глава 4. ПЛАНАРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ.....</b>	<b>114</b>
4.1. Общая характеристика .....	114
4.2. Тонкослойная хроматография .....	115
4.2.1. Механизмы разделения и выбор элюента.....	116
4.2.2. Сорбенты.....	117
4.2.3. Техника выполнения .....	120
4.2.4. Хроматографические характеристики .....	122
4.2.5. Типы элюирования.....	124
4.2.6. Способы детектирования.....	126
4.2.7. Количественное определение.....	127
4.3. Хроматография на бумаге .....	128
<b>Глава 5. СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ .....</b>	<b>135</b>
<b>Глава 6. ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ.....</b>	<b>138</b>
6.1. Аппаратура .....	138
6.1.1. Хроматографы.....	139
6.1.2. Масс-спектрометры .....	140
6.1.3. Система газовый хроматограф — масс-спектрометр.....	148
6.1.4. Система жидкостный хроматограф — масс-спектрометр.....	153
6.2. Методы хромато-масс-спектрометрии.....	158
6.2.1. Ионная масс-хроматография.....	158
6.2.2. Хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения.....	159
6.2.3. Получение производных анализируемых веществ.....	159
6.2.4. Идентификация соединений в смесях.....	163
6.2.5. Количественный анализ.....	167
6.3. Применение хромато-масс-спектрометрии.....	169
6.3.1. Лекарственные вещества и их метаболиты .....	169
6.3.2. Клиническая биохимия.....	171
6.3.3. Определение токсикантов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды .....	172
<b>Глава 7. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ.....</b>	<b>175</b>
7.1. Общая характеристика .....	175
7.2. Методы электрофореза.....	176
7.3. Капиллярный электрофорез.....	179
<i>Заключение.....</i>	<i>183</i>
<i>Словарь основных терминов.....</i>	<i>186</i>

*Приложения*

1. Растворители и адсорбенты, применяемые в жидкостной адсорбционной хроматографии.....	192
2. Параметры полярности растворителей при 25 °С .....	194
3. Свойства растворителей, применяемых в жидкостной хроматографии.....	196
4. Спектрофотометрическое детектирование модифицированных производных природных соединений .....	197
5. Спектральные характеристики флуоресцирующих лекарственных веществ .....	197
6. Соединения, обнаруживаемые флуориметрическим детектором после их химической модификации.....	198
7. Миксотропная серия растворителей .....	198
8. Проявители для ТСХ.....	199

<i>Литература</i> .....	204
-------------------------	-----

Только самые мудрые и самые  
глупые не поддаются обучению.

*Конфуций*

## **Предисловие**

Развитие науки и техники, а также подготовка высококвалифицированных кадров невозможны без применения новых методов исследования и анализа.

Хроматография относится к современным методам анализа и позволяет успешно решать сложные задачи анализа различных объектов. Этот метод находит широкое применение в химии, биологии, фармации и других областях науки и техники. В настоящее время около 60 % всех анализов выполняется с использованием хроматографических методов.

Хроматография была и остается востребованным методом идентификации, количественного анализа и физико-химических исследований. Успешно развиваются и новые варианты хроматографических методов — хромато-масс-спектрометрия, сверхкритическая флюидная хроматография и др.

Хроматографические методы анализа широко используются как при создании новых лекарственных средств, так и при их стандартизации и контроле качества.

Сегодня общепризнано, что проведение биоэквивалентных исследований и решение задач химико-токсикологического анализа практически невозможно без использования хроматографических методов. Высокая чувствительность и избирательность, достаточная точность и скорость определения — основные достоинства хроматографических методов.

Необходимо отметить, что по ряду причин (дорогостоящие приборы и оборудование, специальная подготовка персонала и др.) достижения хроматографической науки используются пока не в полной мере.

В настоящее время издано много книг, как по отдельным методам хроматографического анализа, так и по общим вопросам хроматографии. Однако такая литература малодоступна широкому кругу студентов.

Решение аналитических задач с применением хроматографии невозможно без знания ее основ, которые по существу являются общими для всех хроматографических методов.

Основы хроматографических методов студенты изучают на занятиях по аналитической химии, а затем на старших курсах при изучении специальных дисциплин применяют хроматографические методы для решения практических задач. Поэтому на старших курсах возникает потребность в восстановлении и углублении знаний теории и практики хроматографических методов.

В пособии даны основные понятия и термины, рассмотрены наиболее часто используемые хроматографические методы анализа, а также их достоинства и недостатки.

Автор искренне благодарен рецензентам: В.А. Винарскому — доценту БГУ и С.В. Ткачеву — доценту БГМУ за ценные советы и замечания.

## Список основных сокращений и условных обозначений

ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ГАХ – газoadсорбционная хроматография  
ГЖХ – газо-жидкостная хроматография  
ГХ – газовая хроматография  
ГХ-МС – газовая хроматография-масс-спектрометрия  
ЖАХ – жидкостная адсорбционная хроматография  
ЖРХ – жидкостная распределительная хроматография  
ЖХ – жидкостная хроматография  
ЖХ-МС – жидкостная хроматография-масс-спектрометрия  
ИМХ – ионная масс-хроматография  
КЭ – капиллярный электрофорез  
МС – масс-спектрометрия  
МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения  
НЖФ – неподвижная жидкая фаза  
НФ – неподвижная фаза  
НФХ – нормально-фазовая хроматография  
ОФХ – обращенно-фазовая хроматография  
ПФ – подвижная фаза  
СФХ – сверхкритическая флюидная хроматография  
ТСХ – тонкослойная хроматография  
ХИ – химическая ионизация  
ХМС – хромато-масс-спектрометрия  
ЭУ – электронный удар  
 $t_R$  – время удерживания  
 $V_R$  – удерживаемый объем  
 $R_f$  – подвижность  
 $R_s$  – критерий разделения (разрешение)  
 $\alpha$  – фактор (коэффициент) разделения (селективности)  
 $k'$  – коэффициент емкости  
 $N$  – число теоретических тарелок  
 $H$  – высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)



Ему дано открыть хроматографию —  
разделяющую молекулы, объединяющую  
людей.

*Из эпитафии, посвященной М.С. Цвету*

## ВВЕДЕНИЕ

Хроматография — это метод разделения веществ или частиц, основанный на физических и химических взаимодействиях, относящийся к инструментальным методам анализа и исследования веществ. При перемещении смеси через слой неподвижной фазы в результате повторения многократных актов сорбции и десорбции происходит разделение ее компонентов, основанное на разнице констант распределения веществ между фазами.

Основное преимущество хроматографических методов — возможность проводить одновременно разделение, идентификацию и количественное определение веществ.

Хроматографию рассматривают как науку, процесс и метод.

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

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

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

Впервые процесс разделения красителей методом фронтального проявления на бумаге описал в 1850 г. немецкий химик Рунге. Однако основателем хроматографии справедливо считают русского ботаника-физиолога и биохимика Михаила Семёновича Цвета (1872–1919). Родился он в итальянском городе Асти. Его мать — итальянка Мария Де Дороцца — приемная дочь в семье писателей братьев Алексея, Александра и Владимира Жемчужниковых (литературный псевдоним Козьма Прутков). Отец — Семён Николаевич Цвет — государственный служащий, уроженец г. Чернигова.



Цвет Михаил Семёнович  
(1872–1919)

М.С. Цвет окончил Женевский университет (1893) и в 1896 г. защитил магистерскую диссертацию «Исследование физиологии клетки».

С 1903 по 1916 г. он жил в Варшаве, где работал сначала в университете, а с 1908 г. — в Политехническом институте. В 1910 г. защитил докторскую диссертацию в Варшавском университете. В 1916–1918 гг. Цвет жил и работал в Москве, Нижнем Новгороде и Тарту. Умер 26 июня 1919 г. в Воронеже и похоронен на кладбище Алексеевского монастыря (разрушен в годы Второй мировой войны).

Магистерская диссертация ученого посвящена исследованию строения хлорофильного зерна, и уже в этой работе видны зачатки хроматографиче-

ского метода, хотя в первых опубликованных работах термина «хроматография» нет.

В докторской диссертации «Хромофиллы в растительном и животном мире» Цвет излагает основные результаты исследований с применением хроматографии. Он вводит новые термины: хроматография (от греч. *chrōma* — цвет и *graphō* — пишу), хроматограмма, проявление, вытеснение. Основная заслуга Цвета в том, что он открыл проявительный вариант хроматографии, создал основы сорбционного разделения сложных смесей. В своих опытах Цвет использовал хроматографический метод и для количественного анализа (он разбивал стеклянную колонку и разделял адсорбент на слои). Метод, разработанный Цветом, получил название «колоночная хроматография». Однако довольно длительное время (около 20 лет) хроматография использовалась редко. Только в 1931 г. Р. Кун, А. Винтерштейн и Е. Ледерер, ознакомившись с книгой Цвета на немецком языке, воспроизвели его первоначальные опыты (разделили каротины моркови, лепестков одуванчика и желтка куриного яйца).

Значительный вклад в развитие хроматографии внесли советские ученые Н.А. Измайллов и М.С. Шрайбер, предложившие в 1938 г. разделять вещество на пластинке, покрытой тонким слоем сорбента. Так возникла тонкослойная хроматография. В 1940–1942 гг. А. Тизелиус и С. Клессон предложили фронтальный и вытеснительный методы хроматографии.

В 1952–1953 гг. А.Дж. Мартин и А. Джеймс разделили смеси на сорбенте из силикона и стеариновой кислоты, используя вариант газовой распределительной хроматографии. С этого времени метод газовой хроматографии интенсивно развивается. В качестве подвижной фазы используют азот, водород, гелий, аргон и другие газы. Разделение летучих соединений основано на различии в летучести и адсорбируемости основных компонентов смеси. Основным недостатком газовой хроматографии является то, что этот метод позволяет разделять летучие вещества с относительно низкими молекулярными массами ( $\leq 400$ –500).

В 1952 г. А.Дж. Мартин и Р. Синг получили Нобелевскую премию за исследования в области распределительной хроматографии. Следует отметить, что за разработки различных вариантов хроматографии, а также за исследования в области химии, физиологии и медицины, в которых широко применялась хроматография, присуждено 14 Нобелевских премий.

Период развития жидкостной хроматографии начинается с середины 70-х гг. XX в. Метод жидкостной хроматографии позволяет разделять как неорганические ионы, так и тяжелые органические молекулы, полимеры, вирусы и частицы с молекулярной массой до 107. При оптимальном выборе подходящего сорбента и системы растворителей возможно разделение любых объектов. Однако широкое использование метода жидкостной хроматографии не ущемляет позиций газовой хроматографии. Соединения с молекулярной массой до 500 — основные объекты анализа методом газовой хроматографии — составляют около 5 % от общего количества известных соединений, но около 70–80 % соединений, используемых в промышленности и в быту, как раз и являются объектами газовой хроматографии.

Разделение смеси ионов в растворе возможно методом ионообменной хроматографии, при котором происходят обменные реакции между ионами сорбента и ионами, находящимися в растворе. Зна-

чительный вклад в развитие этого метода внесли Т.Б. Гапон, Е.Н. Гапон и Ф.М. Шемякин, которые впервые применили метод ионнообменной хроматографии (1947). В 1948 г. Т.Б. Гапон и Е.Н. Гапон предложили метод осадочной хроматографии, основанный на различии растворимости труднорастворимых осадков.

В 1957 г. М. Голей предложил метод капиллярной хроматографии (сорбент наносится на внутренние стенки капиллярной трубки).

В 60-х гг. XX в. было открыто еще одно направление хроматографии — гель-хроматография (разделение смеси веществ основано на различии их способности проникать в гель). Вещества, имеющие различную молекулярную массу, легко разделяются этим методом.

Интенсивно развивающаяся с 60-х гг. XX в. высокоэффективная жидкостная хроматография обязана своими успехами теоретическим, методическим и аппаратным достижениям, накопленным в процессе развития газовой хроматографии.

Основными достоинствами хроматографического метода являются высокая чувствительность, избирательность, высокая эффективность, отсутствие в большинстве случаев химических изменений в разделяемых веществах.

Хроматографические методы относятся к гибридным методам. Понятие и термин «гибридные методы» ввел в 1977 г. академик РАН Ю.А. Золотов: «...гибридными мы считаем способы анализа, в которых органически объединено разделение и определение». Известны и другие гибридные методы: экстракционно-фотометрический, экстракционно-люминесцентный, экстракционно-атомно-абсорбционный и др.

Любые варианты хроматографического метода основываются на общем принципе, сформулированном М.С. Цветом, — компоненты разделяемой смеси распределяются между двумя фазами (подвижной и неподвижной). Наряду с М.В. Ломоносовым и Д.И. Менделеевым, М.С. Цвет считается самым известным в мире русским ученым.

Основная теоретическая и методическая информация, необходимая для сознательного освоения хроматографических методов анализа, будет рассмотрена далее.

## Глава 1

# ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

### 1.1. Классификация хроматографических методов

Хроматографические методы классифицируют по различным признакам:

- агрегатное состояние подвижной и неподвижной фаз;
- механизм взаимодействия сорбент — сорбат;
- техника выполнения;
- цель проведения хроматографии и др.

В зависимости от **агрегатного состояния подвижной фазы** различают газовую и жидкостную хроматографию; неподвижная фаза может быть как твердая, так и жидкая.

Основные разновидности газовой хроматографии — газодсорбционная (газотвердофазная) и газо-жидкостная. К жидкостной хроматографии относятся жидкотвердофазная, жидко-жидкофазная (распределительная), жидко-гелевая.

По **агрегатному состоянию фаз хроматографической системы** различают газомезофазную и полифазную хроматографии.

*Газомезофазная хроматография* — хроматографический метод, в котором подвижной фазой служит газ или пар, а неподвижной — вещество в жидкокристаллическом состоянии (мезофаза).

*Полифазная хроматография* — хроматографический метод, в котором в качестве подвижной и/или неподвижной фазы используются гетерогенные системы. Разновидностями полифазной хроматографии являются *полифазная жидкостная* (в качестве подвижной фазы используется эмульсия или суспензия) и *полифазная газовая* (неподвижной фазой служит эмульсия).

Классификация хроматографических методов по механизму взаимодействия сорбента и сорбата является весьма условной, так как обычно процесс разделения компонентов протекает по не-

скольким механизмам. При наличии доминирующего механизма различают распределительную, ионообменную, эксклюзионную, адсорбционную и другие виды хроматографии.

По **технике выполнения** (в зависимости от способа перемещения анализируемой смеси через слой неподвижной фазы) выделяют проявительную, вытеснительную и фронтальную хроматографии.

*Проявительная (элюентная) хроматография* применяется наиболее часто при разделении сложных смесей. Проходящий через колонку газ-носитель или растворитель разделяет компоненты смеси на зоны: в верхней части колонки остаются компоненты, которые хорошо сорбируются, а ниже располагаются менее сорбирующиеся. Элюентная хроматография является основным способом получения хроматограмм в колоночной хроматографии

*Вытеснительная хроматография* основана на разделении компонентов смеси с помощью вещества (вытеснителя), обладающего большей сорбируемостью, чем разделяемые вещества. Разделяемые вещества перемещаются впереди вытеснителя в соответствии со скоростью его движения. Недостаток вытеснительного метода — частое наложение зоны одного вещества на зону другого, поскольку зоны разделяемых веществ не разделены растворителем.

*Фронтальная хроматография* — метод, в котором смесь веществ непрерывно вводится с жидкой подвижной фазой и разделяется в колонке на примыкающие друг к другу зоны с последовательно увеличивающимся числом компонентов, выходящих в порядке увеличения их сорбируемости. Этот метод используется в основном для очистки раствора от примесей, которые сорбируются лучше основного компонента.

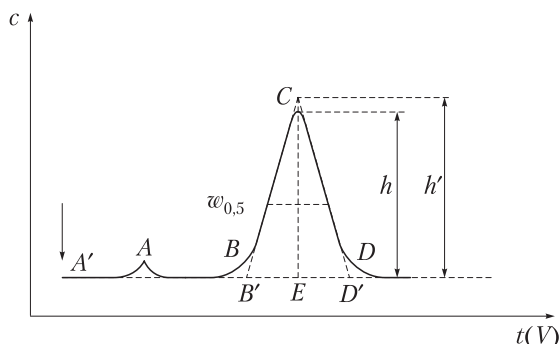
В зависимости от **аппаратурного оформления** хроматографического процесса различают колоночную и плоскостную хроматографию. В колоночной хроматографии сорбент находится в колонке, подвижная фаза и анализируемая проба движутся вдоль слоя сорбента. Движение подвижной фазы происходит из-за разницы давления на входе и на выходе из колонки.

Если неподвижная фаза нанесена на внутренние стенки капилляра, то это *капиллярная хроматография*.

В зависимости от **способа получения** различают внутренние и внешние хроматограммы. В плоскостной хроматографии (тон-

кослойная и бумажная) получают внутренние хроматограммы — компоненты пробы проходят разное расстояние за одинаковое время, в колоночной хроматографии получают внешние хроматограммы — компоненты проходят одинаковый путь по колонке и через различное время выходят из нее.

*Внешняя хроматограмма* — функция концентрации ( $c$ ) определяемых веществ в подвижной фазе после хроматографического разделения от времени ( $t$ ) или объема ( $V$ ) элюата (рис. 1.1).



**Рис. 1.1.** Общий вид внешней хроматограммы

После ввода пробы (точка  $A'$ ) появлению несорбируемого компонента соответствует точка  $A$ . Кривую  $BCD$  называют хроматографическим пиком, а также хроматографической полосой или зоной. Основными характеристиками хроматографического пика являются: высота  $h$  или  $h'$ , ширина — расстояние между точками контура пика на половине высоты ( $w_{0,5}$ ) или на другой высоте. Линия  $B'D'$  — это ширина пика у основания.

Линия  $A'B$  — это нулевая, или базовая, линия, соответствующая нулевой концентрации анализируемых веществ в элюате.

Вариантами плоскостной хроматографии являются *бумажная* (разделение веществ на специальной бумаге) и *тонкослойная* хроматографии (разделение веществ в тонком слое сорбента).

По **цели проведения** хроматографического процесса различают аналитическую (метод качественного и количественного анализа смесей веществ), препаративную (получение чистых целевых компонентов путем выделения их из сложных по составу объектов) и промышленную (производственную) хроматографию.

## 1.2. Хроматографические параметры

Основными хроматографическими параметрами являются время удерживания и удерживаемый объем.

**Время удерживания**  $t_R$  состоит из времени пребывания вещества в подвижной фазе ( $t_m$ ) и времени пребывания вещества в неподвижной фазе ( $t_s$ ):

$$t_R = t_m + t_s. \quad (1.1)$$

Значение  $t_R$  зависит от природы вещества, сорбента и других факторов, поэтому введено понятие «исправленное» (приведенное) время удерживания ( $t'_R$ ), которое определяют по внешней хроматограмме (см. рис. 1.1): отрезок  $A'E$  соответствует  $t_R$ , отрезок  $AE - t'_R$ .

Приведенное время удерживания

$$t'_R = t_R - t_o, \quad (1.2)$$

где  $t_o$  — время удерживания несорбируемого компонента, или мертвое время.

На практике подобрать полностью несорбируемый компонент не всегда удается, поэтому используют время удерживания наименее сорбируемого компонента.

Для характеристики удерживания используется также **удерживаемый объем** ( $V_R$ ) — это объем подвижной фазы, необходимый для элюирования определяемого вещества:

$$V_R = t_R v, \quad (1.3)$$

где  $v$  — объемная скорость газа-носителя.

Удерживаемый объем несорбируемого компонента характеризует величина  $V_o$  — объем подвижной фазы для элюирования несорбируемого компонента, или мертвый объем колонки.

Приведенный удерживаемый объем

$$V'_R = V_R - V_o. \quad (1.4)$$

Истинный (эффективный) удерживаемый объем:

$$V_N = j V'_R, \quad (1.5)$$

где  $j$  — коэффициент сжимаемости (коэффициент Мартина),



$$j = (3/2)[(p_1/p_0)^2 - 1] / [(p_1/p_0)^3 - 1], \quad (1.6)$$

где  $p_1, p_0$  — давление на входе и выходе из колонки.

Если значение эффективного объема отнести к единице массы сорбента и привести его к нормальной температуре, то получим *абсолютный удельный удерживаемый объем* ( $V_g$ ) при нормальной температуре:

$$V_g = \frac{273,16 V_N}{m T_K}, \quad (1.7)$$

где  $m$  — масса сорбента;  $T_K$  — температура колонки.

Величина  $V_g$ , отнесенная к единице массы сорбента и приведенная к нормальной температуре, является характеристикой свойств системы сорбат — сорбент и может быть использована для расчета некоторых физико-химических свойств, а также для качественной характеристики вещества.

На практике для идентификации разделенных веществ обычно используют относительный удерживаемый объем:

$$V_{\text{отн}} = V'_R / V'_{R(\text{ст})}, \quad (1.8)$$

где  $V'_R, V'_{R(\text{ст})}$  — приведенный удерживаемый объем соответственно определяемого и стандартного вещества.

Для объективной оценки хроматографического процесса используют фактор (степень, коэффициент) разделения ( $\alpha$ ) и критерий разделения ( $R_s$ ).

*Фактор разделения* характеризует селективность разделения:

$$\alpha = V_{R2} / V_{R1} = t_{R2} / t_{R1} = D_2 / D_1 = k'_2 / k'_1, \quad (1.9)$$

где  $V, t, D, k'$  — соответственно объем, время удерживания, коэффициент распределения и коэффициент емкости.

Коэффициент емкости является мерой относительной подвижности определяемых веществ.

**Селективность** — способность хроматографической системы (сорбента и подвижной фазы) разделять определяемые компоненты. Разделение возможно при  $\alpha > 1$ .

Эффективность колонки определяется (разрешением) *критерием разделения*:

$$R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2), \quad (1.10)$$

где  $t_R$ ,  $w$  — соответственно время удерживания и ширина хроматографических пиков у основания.

Если  $w_1 = w_2$ , то

$$R_s = \Delta t_R / w.$$

В плоскостной хроматографии расчет критерия разделения проводят по формуле

$$R_s = 2(L_2 - L_1) / (y_1 + y_2), \quad (1.11)$$

где  $L_1$ ,  $L_2$  — расстояние от линии старта до центра пятен 1 и 2;  $y_1$ ,  $y_2$  — ширина пятен.

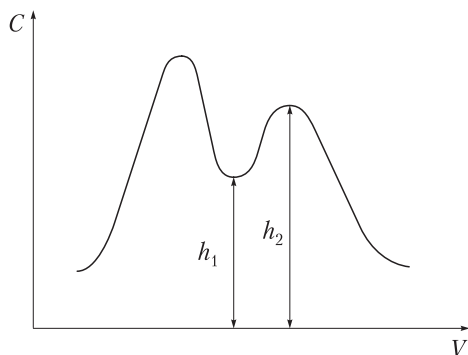
При  $R_s = 0$  вещества не разделяются, разделение возможно при  $R_s \geq 1$ .

При перекрывании хроматографических пиков определение их ширины невозможно. В таких случаях разделительную способность (степень разделения) хроматографической системы определяют по формуле

$$\Psi = (h_2 - h_1) / h_2, \quad (1.12)$$

где  $h_1$  — высота минимума между пиками;  $h_2$  — высота меньшего пика (рис. 1.2).

При  $\Psi = 0$  хроматографические зоны веществ перекрываются полностью, при  $\Psi = 1$  полностью разделяются.



**Рис. 1.2.** Вид внешней хроматограммы при перекрывании пиков

*Коэффициент асимметрии*  $A_c$  равен отношению двух отрезков на горизонтальной линии, проведенной на высоте 10 % от основания пика, при ее пересечении с вертикалью, опущенной из вершины пика. Обычно значения  $A_c$  лежат в интервале 0,7–1,5, для лучших колонок — 0,9–1,2. Значительное отклонение значения  $A_c$  от 1 связано с неравномерным распределением пробы по сечению колонки, наличием мертвых объемов, плохим качеством обработки стенки колонки и другими причинами.

При достижении равновесия в хроматографической системе распределение вещества между подвижной и неподвижной фазами характеризуют *коэффициентом распределения*:

$$D = C_s / C_m, \quad (1.13)$$

где  $C_s$ ,  $C_m$  — концентрация вещества соответственно в неподвижной (стационарной) и подвижной (мобильной) фазе.

На величину коэффициента распределения влияют различные факторы: природа и концентрация хроматографируемого вещества; природа подвижной и неподвижной фаз; температура; давление. От величины  $D$  зависит скорость прохождения вещества по сорбенту: с наибольшей скоростью продвигаются вещества с малыми значениями коэффициента распределения.

Коэффициент распределения связан с приведенным объемом удерживания вещества  $V'_R$  и объемом неподвижной фазы  $V_s$  соотношением

$$V'_R = DV_s. \quad (1.14)$$

Важной характеристикой межфазного распределения в хроматографической колонке является коэффициент, или фактор емкости (удерживания) колонки ( $k'$ ). **Коэффициент емкости** — отношение количества вещества в неподвижной фазе к количеству вещества в подвижной фазе:

$$\begin{aligned} k' = g_s/g_m &= (V_R - V_o)/V_o = (t_R - t_o)/t_o = V'_R/V_o = t'_R/t_o = \\ &= (1 - R_f)/R_f = D(V_s/V_m), \end{aligned} \quad (1.15)$$

где  $g_s$  и  $g_m$  — масса вещества в неподвижной и подвижной фазах;  $V_s$  — объем неподвижной фазы;  $R_f$  — коэффициент подвижности;  $V_m$  — объем подвижной фазы.

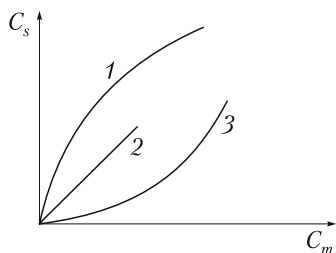
Отношение  $V_m/V_s$  называется *фазовым отношением* ( $\beta$ ). С учетом этого в соответствии с формулой (1.15) можно записать:

$$k' = D/\beta, \text{ или } D = k' \beta. \quad (1.16)$$

Зависимость между временем удерживания, коэффициентом емкости, длиной колонки ( $L$ ) и линейной скоростью подвижной фазы ( $U$ ) выражается формулой

$$t_R = \frac{L}{U}(1 + k'). \quad (1.17)$$

Величина  $k'$  показывает, во сколько раз больше вещество находится в неподвижной фазе, чем в подвижной. При малом значении  $k'$  вещество плохо удерживается в неподвижной фазе и продвигается по колонке с такой же скоростью, что и подвижная фаза. Высокие значения  $k'$  свидетельствуют о сильном взаимодействии веществ с неподвижной фазой и соответственно большой продолжительности анализа. Оптимальные значения  $k'$  от 1,5 до 4.



**Рис. 1.3.** Изотермы сорбции:

- 1 — выпуклая (изотерма Ленгмюра);
- 2 — линейная (изотерма Генри);
- 3 — вогнутая изотерма

Процесс сорбции хроматографируемых веществ описывается изотермой сорбции (рис. 1.3). Линейная зависимость сорбции вещества от его концентрации в подвижной фазе (изотерма Генри) наблюдается при малых концентрациях сорбируемого вещества:

$$C_s = DC_m. \quad (1.18)$$

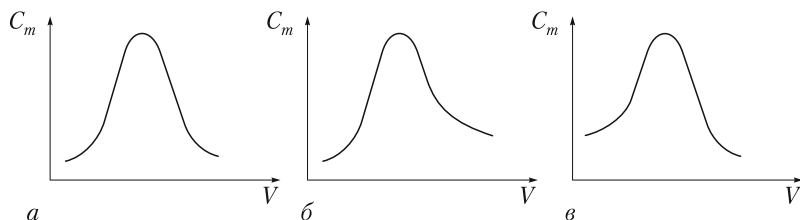
При высокой концентрации сорбируемого вещества происходит сорбционное насыщение и наблюдается выпуклая изотерма сорбции (изотерма Ленгмюра). В этом случае зависимость сорбции от концентрации хроматографируемого вещества в подвижной фазе описывается уравнением Ленгмюра:

$$C_s = (C_s)_\infty [(bC_m)/(1 + bC_m)], \quad (1.19)$$

где  $(C_s)_\infty$  — максимальная концентрация вещества в неподвижной фазе;  $b$  — константа равновесия сорбционного процесса.

Появление вогнутых изотерм можно объяснить более сильным взаимодействием молекул сорбат — сорбат или сорбат — подвижная фаза по сравнению с взаимодействием молекул сорбат — сорбент. В этом случае не достигается сорбционное насыщение.

При линейной изотерме сорбции (рис. 1.4, *а*) получаются симметричные хроматограммы (пики).



**Рис. 1.4.** Формы хроматограмм в зависимости от вида изотерм сорбции: *а* — линейная; *б* — выпуклая; *в* — вогнутая

При работе с малыми концентрациями веществ, т.е. в линейной части изотермы сорбции, величины  $V_R$ ,  $D$  и  $R_f$  постоянны и не зависят от концентрации вещества.

Из рассмотренных хроматографических параметров вытекает основной принцип проведения хроматографического разделения: полное разделение веществ возможно в том случае, когда вещества имеют различные значения коэффициента распределения и соответственно перемещаются с различными скоростями.

### 1.3. Теории хроматографического разделения

Рассмотрим основные теории хроматографии: классическую теорию (концепцию) теоретических тарелок и кинетическую (теорию скоростей).

**Теория теоретических тарелок.** Согласно теории теоретических тарелок, разработанной А. Мартином и Р. Сингом, хроматографическая колонка мысленно делится на участки — «тарелки», на которых быстро устанавливается равновесие между сорбентом и подвижной фазой. Новая порция подвижной фазы смещает это равновесие и переносит вещество на следующую тарелку, и таким образом вещество распределяется на нескольких тарелках.

Концентрация вещества на средних тарелках достигает максимального по сравнению с соседними тарелками значения. Мерой эффективности колонки является число  $N$  теоретических тарелок, характеризующее степень размывания вещества по слою сорбента:

$$N = \frac{L}{H}, \quad (1.20)$$

где  $L$  — длина слоя сорбента, на которой размещено  $N$  теоретических тарелок;  $H$  — высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ).

Существует связь между  $H$ ,  $N$  и другими хроматографическими характеристиками:

$$H = w^2 L / 16 t_R^2, \quad (1.21)$$

$$N = 16 (t_R / w)^2, \quad (1.22)$$

где  $w$  — ширина пика у основания (отрезок  $B'D'$ , см. рис. 1.1).

Более правильные результаты получаются по модифицированному уравнению с использованием ширины пика  $w_{0,5}$  на половине высоты:

$$N = 5,54 (t_R / w_{0,5})^2. \quad (1.23)$$

Зависимость критерия разделения  $R_s$  от числа теоретических тарелок, коэффициентов разделения (селективности) ( $\alpha$ ) и емкости ( $k'$ ) выражается формулой

$$R_s = (\sqrt{N} / 4) [(\alpha - 1) / \alpha] [k / (1 + k')]. \quad (1.24)$$

Зная  $R_s$ ,  $\alpha$  и  $k'$ , можно рассчитать  $N$ :

$$N = 16 R_s^2 [\alpha / (\alpha - 1)]^2 [(1 + k') / k']. \quad (1.25)$$

Изменяя величины  $\alpha$ ,  $k'$  и  $N$  (или  $H$ ), можно оптимизировать разделение: в газовой хроматографии  $k'$  зависит от температуры, в жидкостной — от состава подвижной фазы;  $N$  зависит от длины колонки;  $\alpha$  можно изменить сменой неподвижной фазы.

При увеличении длины колонки значения  $R_s$  повышаются пропорционально квадратному корню из  $L$ , т.е. удлинение колонки в 4 раза увеличивает разрешение в 2 раза. Между  $R_s$  и  $H$  зависи-

мость обратно пропорциональная: при уменьшении  $H$  в 4 раза  $R_s$  увеличивается только в 2 раза. В наибольшей степени  $R_s$  зависит от коэффициента разделения (селективности) колонки: при изменении  $\alpha$  от 1,02 до 1,04  $R_s$  увеличивается в 2 раза.

ВЭТТ соответствует высоте слоя сорбента, на котором устанавливается равновесное распределение вещества между подвижной и неподвижной фазами. С увеличением эффективности колонки ВЭТТ уменьшается, т.е. чем меньше  $H$ , тем больше устанавливается равновесий.

Теория теоретических тарелок позволяет сравнить эффективность различных колонок, оценить качество сорбента и качество заполнения колонки.

Однако реальный хроматографический процесс протекает непрерывно и эта теория является формальной, поскольку основана на допущении, что хроматографический процесс является дискретным, величины  $N$  и  $H$  являются характеристиками размытости зон, что позволяет определить эффективность хроматографической колонки.

Теория теоретических тарелок не позволяет определить зависимость числа теоретических тарелок и ВЭТТ от скорости подвижной фазы и природы сорбента, она не дает рекомендаций по устранению размытости хроматографических пиков.

**Кинетическая теория.** Кинетическая теория, предложенная датскими химиками Дж. Ван-Деемтером и А. Клинкаенбергом в 1956 г., в отличие от теории теоретических тарелок, учитывает кинетику хроматографического процесса, процессы диффузии, медленное установление равновесия и другие факторы.

Размывание хроматографической зоны обусловлено тремя основными процессами: вихревая диффузия, молекулярная (продольная) диффузия и сопротивление массопереносу (массопередача).

Множество траекторий молекулы при прохождении ее через слой сорбента увеличивают время пребывания молекул одного и того же вещества в колонке и соответственно наблюдается размывание полосы элюирования. Вихревая диффузия не зависит от скорости потока, но зависит от однородности и размера частиц наполнителя. При правильном заполнении колонки влияние вихревой диффузии минимальное.

Миграция молекул из центральной части полосы, где концентрация вещества больше, в сторону с меньшей концентрацией этого вещества является причиной продольной диффузии. Особенно значимо влияние продольной диффузии в газовой хроматографии, так как скорость диффузии в газах значительно больше, чем в жидкостях. Снижение скорости потока повышает степень размывания зоны.

Размывание пика происходит также за счет сопротивления массопереносу при непрерывных переходах вещества из подвижной фазы в неподвижную, и обратно. С увеличением толщины пленки неподвижной фазы размывание пика усиливается за счет замедления массопереноса в неподвижной фазе.

Предложено несколько уравнений, связывающих эффективность колонки с такими параметрами, как скорость потока, размер частиц и характеристика наполнителя. Простейшим уравнением является *уравнение Ван-Деемтера* (ван Деемтера), показывающее соотношение между ВЭТТ и скоростью потока:

$$H = A + \frac{B}{U} + CU. \quad (1.26)$$

В уравнении (1.26)  $H$  представлена как функция линейной скорости подвижной фазы ( $U$ ), коэффициенты  $A$ ,  $B$ ,  $C$  — это константы, полученные при изучении соответственно вихревой и продольной диффузии, массопередачи:

$$A = 2\lambda d_p, \quad (1.27)$$

где  $\lambda$  — коэффициент гомогенности заполнения колонки;  $d_p$  — средний диаметр частиц сорбента;

$$B = 2\gamma D_m, \quad (1.28)$$

где  $\gamma$  — коэффициент извилистости, учитывающий ограничение пути диффузии в колонке;  $D_m$  — коэффициент диффузии хроматографируемого вещества в подвижной фазе.

Третье слагаемое ( $CU$ ) в уравнении (1.26) характеризует скорость распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами:



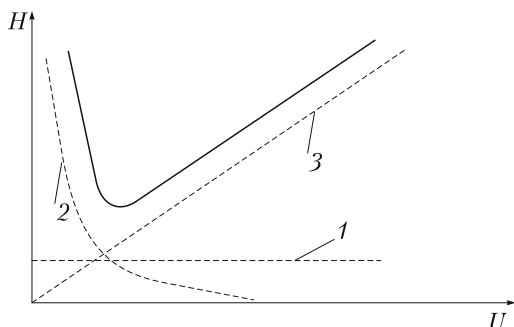
$$C = \frac{8}{\pi^2} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_s^2}{D_s}, \quad (1.29)$$

где  $k'$  — емкость колонки;  $d_s$  — толщина пленки неподвижной фазы;  $D_s$  — коэффициент диффузии вещества в неподвижной фазе.

Если вместо коэффициентов  $A$ ,  $B$ ,  $C$  в уравнение (1.26) подставить выражения (1.27)–(1.29), то уравнение Ван-Деемтера будет иметь вид:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{U} + \frac{8}{\pi^2} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{d_s^2}{D_s} U. \quad (1.30)$$

Влияние каждого слагаемого уравнения (1.26) на величину  $H$ , в зависимости от скорости подвижной фазы, представлено на рис. 1.5.



**Рис. 1.5.** Зависимость ВЭТТ от скорости подвижной фазы (сплошная линия):  
1 —  $A$ ; 2 — изменение  $B/U$ ; 3 — изменение  $CU$

Вклад первого слагаемого ( $A$  — вихревая диффузия) постоянный, так как константа  $A$  связана с вихревой диффузией (диффузией Эдди), зависящей от размера частиц и плотности заполнения колонки стационарной фазой. Вихревая диффузия зависит от структуры сорбента и изменяется по длине колонки. Скорость перемещения подвижной фазы в центре и у стенок колонки различна, поскольку размеры частиц сорбента неодинаковые.

Считают, что  $A$  не зависит от скорости потока, однако при более детальном исследовании обнаружена сложная зависимость величины  $A$  от скорости потока.

Вклад второго слагаемого ( $B/U$  — молекулярная диффузия) значителен при небольшой скорости потока. При высоких скоростях газа-носителя это слагаемое пренебрежительно мало.

Влияние кинетики массопередачи на величину  $H$  описывает третье слагаемое ( $CU$  — сопротивление массопереносу). С ростом скорости потока его влияние возрастает. Коэффициент  $C$  зависит от многих факторов (толщина неподвижного слоя жидкости, коэффициент диффузии растворенного вещества, температура, вязкость растворителя и др.).

Кривая зависимости  $H$  от скорости потока представляет собой гиперболу. Оптимальная эффективность разделения смеси достигается при скорости потока, соответствующей минимальной величине  $H$ ;  $H_{\min}$  наблюдаются при малых размере твердых частиц или толщине пленки неподвижной жидкой фазы, при малом диаметре колонки, а также при больших значениях коэффициентов диффузии в неподвижной фазе и малых — в подвижной фазе. В газовой хроматографии при понижении температуры коэффициенты диффузии в подвижной фазе уменьшаются.

# ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

## 2.1. Общая характеристика

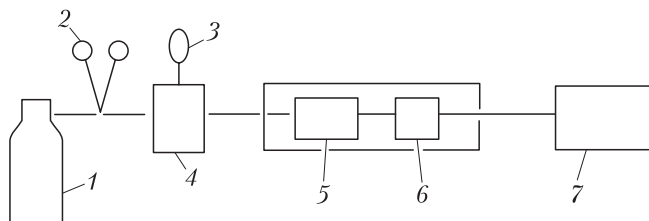
В газовой хроматографии (ГХ) подвижной фазой является газ, а неподвижной — твердый адсорбент (газоадсорбционная или газотвердофазная хроматография) или пленка жидкости, нанесенная на частицы твердого адсорбента (газо-жидкостная хроматография). Жидкость в качестве неподвижной фазы применяется в основном при анализе органических соединений.

К основным характерным особенностям газовой хроматографии относятся:

- высокая чувствительность;
- высокая разделительная способность;
- универсальность;
- экспрессность;
- малый размер пробы;
- возможность автоматизации процесса анализа;
- высокая точность анализа.

Хроматографическое разделение веществ в газовой хроматографии осуществляют с использованием *хроматографов*.

Схема газового хроматографа представлена на рис. 2.1. Газ-носитель из баллона 1 подается через редуктор 2 в хроматографическую установку. С помощью дозатора 3 в поток газа-носителя вводят анализируемую смесь в газообразном состоянии. Жидкие пробы вводят в испаритель 4. Затем анализируемая проба поступает в хроматографическую колонку 5, детектор 6. Сигнал детектора записывается регистрирующим устройством 7. Необходимая для испарителя, колонки и детектора температура поддерживается с помощью термостатов.



**Рис. 2.1.** Схема газового хроматографа

Основным параметром удерживания является время удерживания. Однако на практике вместо времени удерживания используют удерживаемый объем, учитывающий влияние температуры и давления. Общий объем удерживания  $V_R$  и объем подвижной фазы  $V_m$  получают умножением времени удерживания на объемную скорость газа-носителя:

$$V_R = t_R \bar{v}, \quad (2.1)$$

$$V_m = t_m \bar{v}, \quad (2.2)$$

где исправленный объем удерживания — это разность общего объема удерживания вещества и объема удерживания подвижной фазы:

$$V'_R = V_R - V_m. \quad (2.3)$$

Исправленный объем удерживания связан с коэффициентом распределения  $D$ :

$$V'_R = DV'_s. \quad (2.4)$$

С учетом падения давления газа в колонке истинный объем удерживания

$$V_N = jV'_R, \quad (2.5)$$

где  $j$  — коэффициент Мартина [см. формулу (1.6)].

В газовой хроматографии эффективность разделения смеси значительно зависит от степени летучести веществ в условиях разделения. Зависимость отношения коэффициентов распределения веществ ( $D_1, D_2$ ) и соответствующих объемов удерживания ( $V'_{R1}, V'_{R2}$ ) от величины давления ( $p_1, p_2$ ) паров чистых разделяемых веществ

при температуре колонки и коэффициентов активности ( $\gamma_1^\circ, \gamma_2^\circ$ ) этих веществ в неподвижной фазе установлена Е. Херрингтоном:

$$\frac{D_1}{D_2} = \frac{V'_{R1}}{V'_{R2}} = \frac{p_2^\circ \gamma_2^\circ}{p_1^\circ \gamma_1^\circ}. \quad (2.6)$$

Логарифмическая форма уравнения (2.6):

$$\lg \frac{V'_{R1}}{V'_{R2}} = \lg \frac{p_2^\circ}{p_1^\circ} + \lg \frac{\gamma_2^\circ}{\gamma_1^\circ}. \quad (2.7)$$

Из уравнения (2.7) видно, что разделение веществ (отношение величин удерживания) зависит от отношения величин давления паров этих веществ (член летучести) и отношения коэффициентов активности веществ в неподвижной фазе (член селективности). Относительная летучесть веществ зависит от температуры термостата колонки. На селективность оказывают значительное влияние природа неподвижной фазы и характер ее взаимодействия с разделяемыми веществами.

## 2.2. Системы ввода пробы

Ввод пробы осуществляется с помощью дозатора (см. рис. 2.1). Дозатор должен соответствовать определенным требованиям: простота конструкции, отсутствие сорбционной и каталитической активности, воспроизводимость размера пробы и условий ее ввода. Дозирование образцов в газообразном состоянии проводится с помощью шприца или специальных дозирующих устройств (газовый кран, газовый поток, газовая петля).

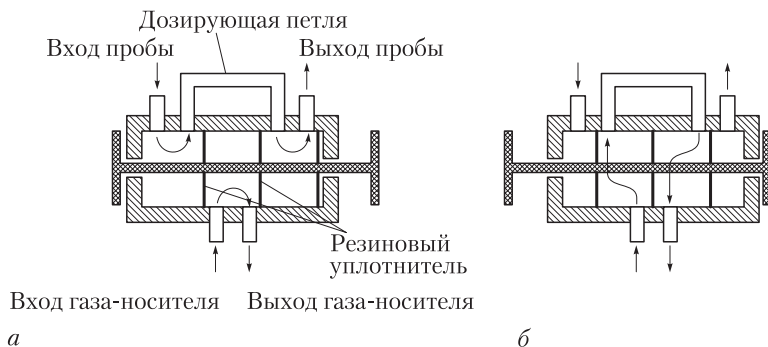
При использовании *шприца* пробу вводят в прибор через самоуплотняющуюся силиконовую мембрану (септа). Объем вводимой пробы — 0,5–20 мкл при использовании набивных колонок.

*Дозирующий газовый кран* отличается большей воспроизводимостью по сравнению со шприцом (воспроизводимость дозирования соответственно 0,5 и 1–5 %). Готовят краны из нержавеющей стали, фторопласта и других полимерных материалов. При повороте крана проба из одной позиции, где находится под давлением, поступает в колонку. Более высокий температурный предел у ме-

таллических кранов, однако их изготовление и эксплуатация значительно труднее.

*Дозирующее устройство с движущимся газовым потоком* имеет тот же недостаток, что и газовый кран: невозможность изменения величины дозируемого объема.

Кран-дозатор со сменными дозирующими газовыми петлями лишен этого недостатка (рис. 2.2).



**Рис. 2.2.** Схема устройства крана-дозатора со сменными дозирующими газовыми петлями:

а — отбор пробы; б — ввод пробы

Применение шприца для ввода жидких проб в непрерывно движущийся поток газа-носителя имеет как достоинства, так и недостатки, поэтому разработаны безмембранные системы ввода.

Наиболее широко применяются микрошприцы МШ-1 и МШ-10 с интервалом дозирования соответственно 0,1–1,0 и 0,2–10,0 мкл, а также микрошприц «Газохром-101» (дозирование до 1 мкл).

Вводимая жидкая проба поступает в испаритель хроматографа или непосредственно в колонку. Источником тепла для мгновенного испарения пробы является материал испарителя. Для изготовления испарителей используют стекло и нержавеющую сталь. Недостатком этих конструкционных материалов является низкая теплопроводность. Температура испарителя обычно на 50 °С выше температуры кипения наименее летучего компонента смеси.

При высокой температуре испарителя некоторые компоненты разрушаются. В системе ввода могут накапливаться следы нелетучих веществ или высококипящие примеси, для испарения которых недостаточно температуры испарителя. Со временем нарушается

механическая прочность мембраны и кусочки силиконовой резины накапливаются в испарителе. Поэтому необходима периодическая чистка испарителя. Чем меньше зона ввода, тем больше время жизни мембраны. Для уменьшения зоны ввода применяют направляющие устройства для иглы шприца.

Некоторые растворители (бензол, тетрахлорид углерода) легко сорбируются мембраной. Мембраны из синтетических эластомеров в результате термодеструкции частично разрушаются с образованием летучих олигомеров или мономеров. Для устранения этих недостатков предложены бислойные мембраны, охлаждение мембраны, безмембранные системы ввода и др. Недостаток безмембранных систем — сложность конструкции и высокая стоимость.

Возможен ввод пробы и непосредственно в колонку. В этом случае конец колонки вводят в испаритель вплоть до мембраны. Высокая температура в начальной части колонки способствует испарению пробы, а поток газа-носителя переносит пробу через колонку, заполненную сорбентом.

При анализе твердых образцов готовят раствор с использованием подходящего растворителя, который и вводят в колонку. Предложен способ ввода твердых проб с помощью специального шприца, когда измельченный образец, находящийся в шприце, выталкивается в испаритель.

*Ввод пробы в капиллярные колонки* осуществляется разными способами: с делением или без деления потока; непосредственно в колонку.

Ввод пробы с делением потока состоит в том, что смесь паров пробы с газом-носителем разделяется на два потока. При этом соотношение потоков бывает от 1/10 до 1/1000; меньший поток поступает в колонку, больший сбрасывается.

Способ ввода пробы с делением потока имеет некоторые недостатки: концентрации анализируемых веществ должны быть в определенном пределе, что обусловлено чувствительностью детектора; происходит разрушение термолабильных соединений при переводе образца в газообразное состояние.

При вводе пробы без деления потока образец полностью попадает в капиллярную колонку. Для анализа берут значительное количество образца (1–5 мкл), которое и подается в испаритель. Этот способ находит применение при анализе природных и про-

мышленных объектов с низкой концентрацией определяемых веществ. Недостатками этого способа ввода проб являются плохая воспроизводимость времени удерживания компонентов и разложение термолабильных соединений.

В системе прямого ввода проб в колонку отсутствуют стадии испарения образца при высоких температурах и не происходит разложения термолабильных соединений.

При анализе биологических жидкостей и тканей содержание летучих веществ определяют *методом равновесной парогазовой фазы (РПФ)*. Сущность метода РПФ заключается в том, что анализируемый объект помещают в герметичный сосуд, выдерживают при определенной температуре, а затем газовую фазу вводят в хроматографическую колонку. В этом методе в испаритель хроматографа не попадают жидкие или твердые пробы, которые при разложении и сорбции могут давать дополнительные пики. Исключается загрязнение колонки и системы ввода пробы при анализе биологических жидкостей (кровь, моча).

Метод РПФ осуществляется в двух вариантах — статическом и динамическом. Статический метод (рассмотрен выше) заключается в установлении равновесия в герметичном сосуде. В динамическом варианте газ непрерывно пропускают через жидкость или твердый материал.

## 2.3. Хроматографические колонки

Различают два типа колонок: насадочные и капиллярные. Колонки выбирают в зависимости от размера термостата. Насадочные колонки применяются более широко.

**Насадочные колонки.** Для изготовления насадочных колонок применяют нержавеющую сталь, стекло и полимерные материалы. Стекланные колонки имеют определенные преимущества перед колонками из нержавеющей стали: не вызывают каталитического разложения определяемых веществ, качество заполнения легко контролируется визуально. Колонки из полимерных материалов применяют довольно редко.

Заполнение колонок проводят с использованием водоструйных, форвакуумных насосов или с помощью вибратора.



Более эффективными являются *микронасадочные колонки* с диаметром менее 2 мм. Получают микронасадочные колонки двумя способами: заполняют трубку готовым сорбентом; после заполнения трубки сорбентом фронтальным методом наносят неподвижную фазу. В микронасадочных колонках ускоряется процесс радиального перемешивания, анализ протекает значительно быстрее, что позволяет использовать такой хроматограф для автоматического регулирования промышленных процессов.

**Капиллярные колонки.** Капиллярная хроматография в ряде случаев вытесняет насадочную, особенно при анализе многокомпонентных смесей. Эффективность разделения на капиллярных колонках может достигать нескольких миллионов теоретических тарелок, в то время как на насадочных колонках она на два порядка ниже.

Капиллярные колонки бывают трех типов:

- содержат неподвижную фазу на гладких стенках — колонки WCOT;
- содержат на стенках пористый материал — колонки PLOT;
- содержат твердый носитель, пропитанный неподвижной фазой, — колонки SCOT.

Высокая эффективность капиллярных колонок проявляется только для веществ с большими значениями коэффициентов распределения. При определении веществ с малыми значениями коэффициентов распределения лучшие результаты дают насадочные или микронасадочные колонки.

Основным материалом для изготовления капиллярных колонок является стекло, обладающее наименьшей адсорбционной и каталитической активностью. Применяются капиллярные колонки и из кварца. Для них характерно низкое содержание гидроксильных групп, способных к образованию водородных связей с молекулами разделяемых веществ. Этот факт способствует хорошему разделению веществ основного характера. Благодаря гибкости и способности упруго выпрямляться кварцевый капилляр, в отличие от стеклянного, легко наматывается на катушку.

Недостатки капиллярных колонок — трудность изготовления, дороговизна, недолговечность, плохая воспроизводимость и сложность в эксплуатации.

Наиболее сложный этап в изготовлении капиллярных колонок — нанесение неподвижной фазы; основные способы нанесения — статический и динамический. При статическом способе капилляр заполняют раствором неподвижной фазы, а затем испаряют растворитель при нагревании. В динамическом способе раствор неподвижной фазы пропускают через колонку, на стенках остается пленка неподвижной фазы.

Техника работы с капиллярными колонками сходна с техникой работы с микронасадочными колонками.

## 2.4. Адсорбенты

В газоадсорбционной хроматографии разделение происходит за счет процессов сорбции/десорбции как в насадочных, так и в капиллярных колонках. Выбор адсорбента имеет важное значение, поскольку основным свойством адсорбционной фазы является ее адсорбционная активность.

Основные требования, предъявляемые к адсорбенту:

- химическая и каталитическая инертность;
- достаточная селективность;
- механическая прочность;
- линейная изотерма адсорбции.

Однако адсорбенты редко отвечают всем перечисленным требованиям, поэтому проводят их модификацию (обработка кислотами, щелочами; связывание гидроксильных групп, расположенных на поверхности; геометрическая модификация и др.).

Наряду с достоинствами (широкий температурный диапазон, стабильность базовой линии, быстрое установление равновесия), газоадсорбционная хроматография имеет и недостатки: асимметричные пики, большое время анализа, каталитическая активность некоторых адсорбентов.

Газоадсорбционная хроматография применяется для разделения газов: азота, водорода, кислорода, метана, диоксида углерода, инертных газов и низкокипящих летучих углеводородов. Методом газоадсорбционной хроматографии на колонках с пористыми полимерными сорбентами или углеродными молекулярными ситами определяют воду в неорганических и органических материалах (растворителях).

Для разделения газов при низкой температуре и низкомолекулярных соединений при высокой температуре используют как неорганические, так и органические полимерные адсорбенты. Применение адсорбентов позволяет достигать высокой селективности при определении газов и легких углеводородов.

**Неорганические адсорбенты.** Из неорганических адсорбентов (активированный уголь, силикагель, оксид алюминия, графитированная сажа, молекулярные сита) в газовой хроматографии в основном используют силикагели (табл. 2.1). Удерживание веществ на силикагелях зависит от условий их термообработки, степени насыщения поверхности водой, удельной поверхности, свойств разделяемых веществ и др.

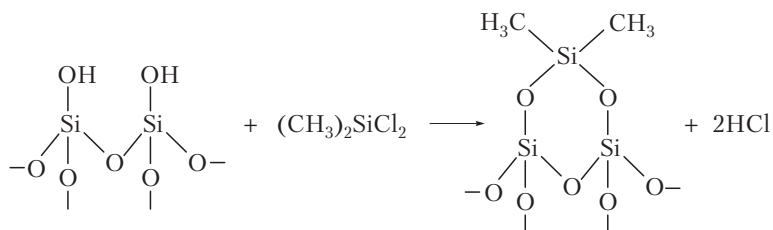
Таблица 2.1

**Свойства некоторых неорганических адсорбентов для газовой хроматографии**

Тип сорбента	Наименование	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Диаметр пор, нм
Силикагель	Сферосил 200	140–230	15
	030	37–62	60
	005	5–15	300
	Порасил В	125–250	10–20
	С	50–100	20–40
	Силохром С 80	70–90	
	С 120	100–150	
Графитированная термическая сажа	Карбопак С	12	
	Карбопак В	100	1,3
	Карбосив	1000	1,5
	Карбосфер	1200	1,3
Натрия алюмосиликат	Молекулярное сито:		
	4А	—	0,4
	13Х	—	1,0
Кальция алюмосиликат	Молекулярное сито 5А	—	0,5

*Силикагель* является гидрофильным адсорбентом с высокоразвитой структурой геля. Наличие силанольных групп  $\equiv \text{SiOH}$  на поверхности силикагеля способствует образованию водородных связей с молекулами сорбата.

Снижение активности силикагеля достигается проведением силинизации по схеме:



Замена OH-групп на группы  $-\text{CH}_3$  устраняет возможность образования водородных связей.

*Активированные угли* относятся к неполярным адсорбентам, имеют сильноразвитую пористую структуру. Получают их при высокотемпературной обработке углеродсодержащего сырья. Активированные угли избирательно адсорбируют углеводороды и их производные, ароматические соединения.

*Графитированную сажу* получают путем обработки обычной сажи при  $3000^\circ\text{C}$  в вакууме или инертном газе. Она относится к неспецифическим адсорбентам, так как ее поверхность не имеет функциональных групп. Применяется для разделения геометрических изомеров. Нанесение тонких пленок пикриновой или фосфорной кислоты на поверхность графитированной сажи влияет на адсорбционные свойства.

*Цеолиты* сорбируют вещества, способные проникать внутрь кристаллической решетки. Кристаллическая решетка цеолитов состоит из кремний-алюмо-кислородных кубооктаэдров. Применяются цеолиты для разделения легких углеводородов, смеси ароматических углеводородов, а также смесей газов.

Цеолиты (молекулярные сита) сорбируют вещества с линейной структурой (нормальные углеводороды), что позволяет отделять нормальные парафины от разветвленных и циклических парафинов.

**Полимерные сорбенты.** При получении пористых полимерных сорбентов смесь мономеров и сшивающих агентов полимеризуется в присутствии катализатора. В качестве органического растворителя чаще всего используют изоктан, так как он является не только хорошим растворителем мономеров, но и способствует осаждению образующегося сополимера, что приводит к формированию его макропористой структуры. Структура пор и химические

свойства сорбента регулируются в процессе синтеза (табл. 2.2). Полимерные сорбенты имеют высокоразвитую поверхность (20–700 м<sup>2</sup>/г), обладают хорошей механической прочностью, высокой селективностью и термической стабильностью.

Таблица 2.2

## Свойства пористых полимерных сорбентов

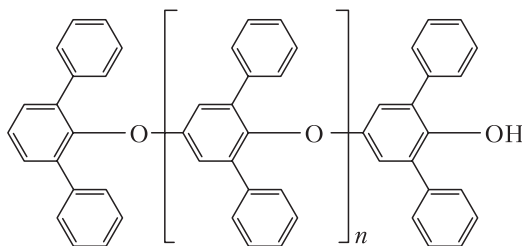
Сорбент	Тип	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Средний радиус пор, нм	Температурный предел, °С
Порапак Р	Ст-ДВБ	225–300		250
Порапак Q	ЭВБ-ДВБ	500–700	4	250
Порапак S	ВПир	300–450	5	250
Хромосорб 101	Ст-ДВБ	50	300–400	275
Хромосорб 102	Ст-ДВБ	300–500	8	250
Хромосорб 103	ПСт	15–25	150–200	275
Хромосорб 104	АКН-ДВБ	100–200	30–40	250
Хромосорб 107	АЭ	100–200	0,25	250
Полисорб 1	Ст-ДВБ	100–200	60–70	250
Полисорб 2	Ст-ДВБ	40–50	160–200	200
Полисорбонитрил	АКН-ДВБ	80–100	60–70	200
Нитрополисорб 1	ПС-1 с NO <sub>2</sub>	100–250	40–50	200
Аминополисорб 1	ПС-1 с NH <sub>2</sub>	100–250	50–60	250
Нитрополисорб 2	ПС-2 с NO <sub>2</sub>	40–50	180–200	180
Тенакс GC	ПДФФО	19		380

*Примечание.* Ст — стирол, ДВБ — дивинилбензол, ЭВБ — этилвинилбензол, ВПир — винилпирролидон, ПСт — полистирол, АКН — акрилонитрил, АЭ — акриловый эфир, ПС — полисорб, ПДФФО — *n*-2,6-дифенилфениленоксид.

Важной характеристикой сорбентов является размер пор: с увеличением размера пор в них быстрее происходит массообмен и соответственно растет скорость анализа. Сорбенты типа «Порапак» наиболее подходящие для анализа газов (табл. 2.3).

Полимерные сорбенты различаются по полярности. К малополярным относятся порапак Q, хромосорб 102 и полисорб 1. Хромосорб 104 и 107, порапак Р, полисорбонитрил — более полярные

сорбенты. Высокополярным является тенакс GC (рис. 2.3). Этот сорбент сильно удерживает воду, что позволяет использовать его при определении в воде примесей углеводородов  $C_2 - C_{16}$ , разделять амины, нитрилы и другие соединения.



**Рис. 2.3.** Тенакс GC — структурная формула

Высокой полярностью отличаются полисорбатазолы, полисорбакрилаты и сфероны.

Введение в полимерную матрицу различных функциональных групп (нитро-, amino-, сульфогруппы) позволяет регулировать свойства полимерных сорбентов. Таким способом получены нитро-, amino- и сульфополисорб.

*Таблица 2.3*

**Области применения пористых полимерных сорбентов**

Сорбент	Определяемые соединения
Порапак Р	Простые и сложные эфиры, нитрилы, нитро-соединения
Хромосорб 101, порапак Р, полисорб 2	Углеводороды, простые и сложные эфиры, кетоны, спирты, альдегиды, жирные кислоты, гликоли
Хромосорб 103	Спирты, альдегиды, кетоны, гидразины, амины, амиды
Хромосорб 106	Серосодержащие газы, кислоты и спирты
Порапак Q, полисорб 1, полисорб 10	Низкомолекулярные кислоты, спирты, кетоны, альдегиды, гликоли, эфиры, нитроалканы, нитрилы
Тенакс GC	Летучие органические соединения (их концентрирование)

Особый интерес представляют комплексоплатные полимерные сорбенты, например поликомплексонаты серебра и меди: первый селективен к ненасыщенным и ароматическим соединениям, второй применяют при разделении оксидов азота.

Следует иметь в виду, что некоторые полимерные сорбенты способны взаимодействовать с аминами (порапак), диоксидом азота (хромосорб 102) и другими соединениями.

Механизм удерживания на полимерных сорбентах различен. При низких температурах удерживание происходит за счет адсорбционных явлений, при высоких — определяется процессами растворения.

Таким образом, основными достоинствами полимерных сорбентов являются высокая механическая прочность, большой суммарный объем пор, повышенная селективность к определяемым группам соединений, что позволяет применять их при анализе как газов, так и высококипящих соединений.

## 2.5. Твердые носители в газо-жидкостной хроматографии

*Твердые носители*, применяемые в газо-жидкостной хроматографии, — это адсорбенты, на которых удерживается неподвижная фаза в виде тонкой пленки. К носителям неподвижных жидких фаз предъявляются определенные требования: механическая прочность, умеренная удельная поверхность ( $20 \text{ м}^2/\text{г}$ ), малый и одинаковый размер частиц, инертность; они не должны изменяться при повышении температуры, должны легко смачиваться подвижной фазой.

Носители бывают минеральные и полимерные (табл. 2.4). Из минеральных сорбентов наиболее широко применяются переработанные диатомиты (скелеты ископаемых одноклеточных простейших организмов).

Для снижения активности диатомитовых носителей их обрабатывают кислотой (удаление металлов) и проводят реакции с диметилдихлорсиланом (ДМДС) или гексаметилдисилазаном (НМДС). При этом силанольные группы превращаются в силильные эфирные группы. Однако даже и при такой обработке активные центры диатомитовых носителей не исчезают полностью, так как часть силанольных групп сохраняется.

Таблица 2.4

**Свойства адсорбентов, широко применяемых  
в качестве носителей**

Носитель	Плотность, г/см <sup>3</sup>	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Объемная удельная поверхность, м <sup>2</sup> /мл	Максимальный процент наносимой фазы	pH
Хромосорб G	0,58	0,5	0,29	5	8,5
Хромосорб Р	0,47	4	1,88	30	6,5
Хромосорб W	0,24	1	0,29	20	8,5
Хромосорб А	0,49	2,7	—	25	7,1
Хромосорб 750	0,36	0,75	0,24	7	—
Хроматон Н	—	3–4	—	30	7,5
Цветохром К	—	1,5–2,5	—	30	6,8
Диахром	—	4	0,6	30	8,5

Способы обработки носителя имеют определенную градацию: NAW — исходный (необработанный), AW — обработанный кислотой, AW-ДМДС — обработанный кислотой и диметилдихлорсилом или другими реагентами. Обработка носителей кислотами или щелочами позволяет уменьшить размывание заднего фронта кислотных и основных компонентов.

Полимерные носители на основе фторполимеров отличаются высокой удельной поверхностью (табл. 2.5).

Таблица 2.5

**Основные свойства полимерных носителей**

Носитель	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Максимальное количество неподвижной фазы, %	Максимальная температура, °С
Флуоропак 80	1,3	2–3	275
Тефлон 6	10,6	15–20	250
Хромосорб Т	8	15–20	250
Полихром 1	12	15–20	240



## 2.6. Неподвижные жидкие фазы

Неподвижные жидкие фазы (НЖФ) должны хорошо растворять компоненты смеси, быть термически и химически устойчивыми, малолетучими, иметь небольшую вязкость, кроме того, должны образовывать равномерную пленку на носителе, максимально разделять компоненты смеси, обладать определенной селективностью и не должны десорбироваться с колонки. Температура кипения НЖФ должна быть примерно на 100 °С выше рабочей температуры колонки.

Различают низкотемпературные НЖФ (до 100 °С), средне- (до 200 °С) и высокотемпературные (до 350 °С).

По относительной полярности ( $P$ ) неподвижные фазы делят на четыре группы: неполярные ( $P = 0-5\%$ ), слабо- ( $P = 5-15\%$ ), средне- ( $P = 15-35\%$ ) и сильнополярные ( $P = 35-100\%$ ).

Полярные НЖФ содержат функциональные группы  $-\text{CN}$ ,  $=\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{CF}_3$  и др. Они селективны к спиртам, органическим кислотам, аминам. Неполярные НЖФ содержат насыщенные углеводороды или силоксаны и применяются для разделения углеводородов и галогенуглеводородов.

Известна и другая классификация НЖФ, в которой они делятся на три группы: неполярные (насыщенные углеводороды и др.), умеренно полярные (сложные эфиры, нитрилы и др.) и полярные (полигликоли, гидроксилламины).

Выбор НЖФ осуществляется в зависимости от полярности разделяемых веществ: время удерживания неполярных соединений увеличивается с уменьшением полярности неподвижной фазы; полярные соединения удерживаются меньше на неполярной фазе, чем неполярные; с ростом полярности неподвижной фазы увеличивается удерживание полярных соединений.

Взаимодействия между разделяемым веществом и неподвижной жидкой фазой могут возникать за счет:

- неспецифических дисперсных сил (силы Лондона) — алканы, бензол;
- ориентационных сил (силы Кессома);
- индукционных сил (силы Дебая);
- сил химических связей в виде комплексов с переносом заряда (между ионом металла и ароматическим углеводородом).

Способность образовывать водородные связи вносит определенный вклад в удерживание.

Химический состав НЖФ разнообразен. Наиболее широко используемые НЖФ: ароматические и неароматические углеводороды, метил- и фенилсиликоны, спирты, полигликоли и сложные эфиры.

Для *ароматических углеводородов* характерна способность селективно удерживать ароматические углеводороды, что объясняется способностью образовывать ассоциированные соединения. Представителем НЖФ такого типа является полифениловый эфир, содержащий большое число фенильных и фениленовых групп. Интервал рабочих температур зависит от молекулярной массы образца: 230–400 °С для образца с молекулярной массой 800; 230–450 °С для образца с молекулярной массой 2100.

*Неароматические углеводороды* являются неполярными соединениями и в них хорошо растворяются все углеводороды. НЖФ этого типа применяются для отделения первичных, вторичных и третичных спиртов от других органических веществ. Разделение углеводородов происходит в соответствии с их температурами кипения. Основные представители этой группы НЖФ: сквалан (интервал рабочих температур 20–150 °С), гексадекан (20–30 °С), парафиновое масло (верхний температурный предел 120 °С).

*Метил- и фенилсиликоны* относятся к наиболее часто применяемым НЖФ, так как имеют определенные преимущества: их можно применять как при низких (–50 °С), так и при высоких температурах (до 350 °С), разделительная способность менее подвержена влиянию вязкости.

Представителями метилсиликонов являются силиконовые масла (температурный интервал 50–220 °С), силиконовый каучук (температурный интервал 25–320 °С).

Для фенилсиликонов, в отличие от метилсиликонов, характерны усиление взаимодействия с ароматическими соединениями, повышенная устойчивость к окислению и нагреванию.

Для масла с небольшим (10 %) содержанием фенильных групп, например OV-3, характерен температурный интервал 50–300 °С. Для масла с высоким содержанием фенильных групп — OV-61 (33 %), OV-17 (50 %), OV-25 (75 %) — 20–375 °С.

Гидроксильные группы *спиртов* способны образовывать водородные связи с атомами-акцепторами кетонов, альдегидов, третичных аминов, простых и сложных эфиров и др. В качестве таких

НЖФ используются гексадециловый спирт (температурный интервал 50–90 °С), октадециловый спирт (60–70 °С), диглицерин (20–100 °С) и полиглицерин (20–200 °С).

Селективность *полиглицелей* зависит в основном от величины их молекулярной массы. Минимальная температура колонки 20–70 °С, максимальная — от 100 °С (молекулярная масса 400) до 210 °С (молекулярная масса 6000).

Атомы кислорода, содержащиеся в *сложных эфирах* фосфорных и карбоновых кислот, способны к образованию водородной связи. Поэтому при применении таких НЖФ наблюдается увеличение времени удерживания веществ, содержащих подвижный водород. К представителям этой группы НЖФ относятся: динонилфталат (интервал температур 20–130 °С), диоктилсебацат (максимальная температура 130 °С), трифенил- (100 °С) и трикрезилфосфат (110 °С).

Высокой термостабильностью отличаются силиконовые полимеры с различными функциональными группами (табл. 2.6).

Таблица 2.6

### Высокотемпературные неподвижные жидкие фазы

Основа	Обозначение	Полярность	Максимальная рабочая температура, °С
Диметилсилоксан	OV-1	Неполярная	320
7%-ный фенилметилсилоксан	SE-52	Малополярная	320
Карборансилоксан	—	Неполярная	460
7%-ный цианпропил	OV-1701	Малополярная	270
Полиэтиленгликоль	CW-20M	Полярная	250

Для растворения НЖФ используют в основном легколетучие растворители: ацетон, бензол, метанол, метилэтилкетон, пиридин, толуол, хлороформ, этилацетат, тетрачлоруглерод. Растворители должны иметь низкую температуру кипения и хорошую растворяющую способность.

К основным **методам пропитки** носителя НЖФ относятся: метод фильтрации, фронтальный метод, метод отгонки и пропитка в парах или распылением. Наиболее простыми являются методы фильтрации и отгонки.

В *методе фильтрации* НЖФ растворяют в подходящем растворителе, добавляют носитель и перемешивают. Затем отфильтровывают твердую фазу и высушивают. Отделить твердую фазу от растворителя можно и методом отгонки растворителя.

При *фронтальном методе* достигается очень равномерное нанесение НЖФ на носитель. Сначала через колонку с носителем пропускают НЖФ до тех пор, пока ее концентрация на выходе из колонки и на входе в колонку будет одинаковой. Растворитель неподвижной жидкой фазы удаляют при пропускании через колонку нагретого инертного газа.

*Метод распыления* НЖФ в кипящем слое позволяет пропитывать большие количества носителя. Смесь паров НЖФ и инертного газа пропускают через колонку, заполненную твердым носителем. В зависимости от длительности процесса достигается определенная степень пропитки.

В практике газовой хроматографии оптимальной является степень пропитки 5–20 %. При чрезмерно высоком содержании НЖФ снижается эффективность разделения, так как насадка становится липкой и частицы склеиваются.

Примеры применения неподвижных фаз для анализа соединений различных классов представлены в табл. 2.7.

Таблица 2.7

### Неподвижные фазы для разделения соединений различных классов

Соединения	Неподвижная фаза
Альдегиды	2-этилгексилловый эфир себадиновой кислоты
Алкалоиды	Силиконы Е-30
Амины ароматические	Карбовакс 400+КОН
Аминокислоты	Силиконы OV-1, OV-101
Галогенуглеводороды	Полисорб 10
Кетоны	Укон В-550Х
Нитроароматические соединения	Силикон ХЕ-60, Р-1000
Пестициды	Силиконы SE-30, SE-50, SP-1000
Высшие спирты	Р-1000, FFAP
Стероиды	F-1
Фенолы	SP-1000
Эфиры	Силиконы, карбоваксы

Высокой термостабильностью обладают **привитые неподвижные фазы** — химически связанные фазы, которые не десорбируются с колонки.

Наносить НЖФ на носитель можно также химическим или физическим методом. В таком случае получают носитель с привитой неподвижной фазой. Прививка НЖФ к поверхности сорбента проводится разными способами, например, силанизация поверхности носителя монофункциональными силанами, конденсация спиртов на пористых силикагелях с последующей высокотемпературной обработкой.

## 2.7. Подвижные фазы

Использование газа в качестве газа-носителя определяется его физическими и химическими свойствами: вязкостью, сорбционными свойствами, коэффициентом диффузии, реакционной способностью. Например, применение водорода в качестве газа-носителя нецелесообразно при анализе ненасыщенных соединений, поскольку возможно их гидрирование.

Основные требования, предъявляемые к газам-носителям:

- инертность к анализируемым веществам, детектору и материалам колонки;
- незначительная сорбируемость;
- взрывобезопасность;
- обеспечение высокой чувствительности детектора;
- возможно меньшая вязкость;
- чистота, доступность и низкая стоимость.

Перечисленным требованиям соответствуют азот, водород, гелий и аргон, другие газы (диоксид углерода, неон, криптон) используются редко. Выбор газа-носителя определяется в основном детектором. Поток газа-носителя обеспечивается избыточным давлением газового баллона, поэтому насос не требуется.

При работе с насадочными колонками при высоких температурах и скоростях газа-носителя водород предпочтительнее азота. Использование водорода в качестве газа-носителя при работе с капиллярными колонками также имеет некоторые преимущества (в 2,0–2,5 раза уменьшается продолжительность анализа).

Введение в газ-носитель аммиака или муравьиной кислоты в ряде случаев повышает селективность и чувствительность определения.

## 2.8. Детекторные системы

**Детектор** — это прибор, который реагирует на изменение какого-либо свойства смеси, выходящей из хроматографической колонки. Свойства смеси определяются ее составом.

Основные требования, предъявляемые к хроматографическим детекторам:

- высокая чувствительность к определяемым веществам;
- пропорциональное изменение величины сигнала детектора в зависимости от концентрации определяемого вещества;
- достаточное быстродействие, т.е. мгновенная регистрация определяемых компонентов;
- наименьший рабочий объем, что исключает дополнительное размывание пиков в детекторе.

Детекторы делятся на дифференциальные и интегральные.

**Дифференциальные детекторы** измеряют концентрацию вещества в потоке подвижной фазы. Различают дифференциальные *концентрационные* детекторы, которые фиксируют изменение концентрации вещества на выходе из колонки, и *потоковые*, фиксирующие произведение концентрации вещества и скорости потока.

**Интегральные детекторы** регистрируют изменение во времени суммарного количества компонентов, выходящих из колонки.

Наиболее простым интегральным детектором является *азотомер*. В качестве газа-носителя применяется диоксид углерода. При поступлении диоксида углерода в раствор щелочи, находящийся в азотомере, газ поглощается, но объем жидкости в азотомере не изменяется. Компоненты анализируемой смеси, вымываемые газом-носителем из колонки, не должны поглощаться раствором щелочи. В этом случае эти газы собираются в микробюретке (азотомер) и вытесняют из нее соответствующий объем раствора.

Основным недостатком интегральных детекторов является низкая чувствительность и значительная инерционность, что ограничивает их практическое применение.

Условно детекторы разделены на ионизационные и неионизационные. В *ионизационном детекторе* анализируемые вещества под действием различных факторов (УФ-свет, излучение, водородное пламя и др.) превращаются в ионы, которые собираются на электродах и регистрируются с помощью усилителя.

Различают также деструктивные и недеструктивные детекторы, универсальные и селективные.

В *деструктивном детекторе* анализируемые вещества разлагаются с образованием других соединений.

Большинство ионизационных детекторов являются деструктивными и селективными, а большинство неионизационных — недеструктивными и универсальными.

*Универсальные детекторы* регистрируют все вещества, поступающие из колонки (детектор по теплопроводности, или катарометр, пламенно-ионизационный и др.).

*Селективные детекторы* наиболее чувствительны к веществам, содержащим определенные химические элементы или группы атомов (детектор электронного захвата (ДЭЗ), термоионный детектор и др.).

Основные параметры, характеризующие детектор, — это чувствительность (порог чувствительности), инерционность и линейно-динамический диапазон, воспроизводимость и стабильность работы.

**Чувствительность** детектора  $S_q$  соответствует отношению выходного сигнала  $R_c$  к измеряемой величине концентрации  $\varphi$ :

$$S_q = R_c / \varphi. \quad 2.8$$

*Порогом чувствительности* или *пределом детектирования* ( $\varphi$ ) называется концентрация анализируемого вещества, которая вызывает сигнал, равный удвоенной величине шумов  $R_{ш}$ :

$$\varphi_0 = 2R_{ш} / S_q. \quad (2.9)$$

*Величина шумов* — это расстояние между крайними положениями нулевой линии на хроматограмме, возникающими от различных посторонних факторов. Порог чувствительности (предельная чувствительность, предел обнаружения) выражают в различных единицах: г/мл, мг/мл, мкг/мл, моль/с, г/с и др. Практически измеряемая детектором минимальная концентрация вещества в про-

бе выше предела обнаружения в 5–10 раз в связи с размыванием пробы в колонке.

Наиболее чувствительные детекторы: ДЭЗ ( $10^{-14}$  г/мл), пламенно-ионизационный детектор ПИД ( $10^{-12}$ – $10^{-15}$  г/с), менее чувствительные – масс- и ИК-спектрометры.

**Инерционность** детектора определяется промежутком времени, в течение которого вещество доставляется к чувствительному элементу. От инерционности детектора зависят форма и высота хроматографического пика.

Возникающий в детекторе сигнал должен быть пропорционален измеряемой величине. Линейная зависимость сигнала устанавливается для каждого типа детектора и соответственно его работа осуществляется в этом диапазоне. Линейная зависимость наблюдается в определенном диапазоне количества вещества; широкий диапазон линейности у ПИД ( $10^7$ ), масс-спектрометра ( $10^6$ ), катарометра ( $10^5$ ).

Обычно линейность детектора составляет 0,95–0,99. **Линейно-динамический диапазон** определяется отношением наибольшей концентрации, при которой наблюдается линейная зависимость, к наименьшей.

**Воспроизводимость** — стандартное отклонение сигналов детектора при вводе в хроматограф одинаковых количеств данного вещества.

**Стабильность работы** детектора характеризуется незначительной зависимостью сигналов детектора от колебаний температуры и скорости подвижной фазы.

В газовой хроматографии применяют более 50 видов детекторов. Здесь рассмотрены основные виды детекторов: детектор по теплопроводности (ДТП), пламенно-ионизационный детектор (ПИД), детектор термоионный (ДТИ), детектор электронного захвата (ДЭЗ). ДТП и ПИД относятся к универсальным, а ДТИ и ДЭЗ — к селективным детекторам.

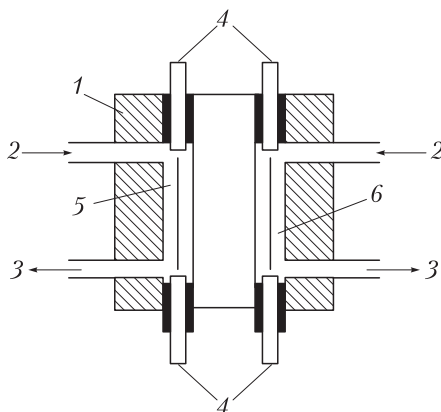
Выбор детектора зависит от числа определяемых веществ, их концентрации в смеси и желаемого времени анализа.

**Детектор по теплопроводности (катарометр).** Принцип работы катарометра основан на изменениях теплопроводности потока газа. Чувствительным элементом такого детектора является электронагреваемый источник тепла (рис. 2.4), температура которого



зависит от теплопроводности окружающего газа. Нагреваемым элементом является металлическая нить, изготовленная из материала, электрическое сопротивление которого значительно зависит от температуры (вольфрам, платина). Нить включается в плечо моста Уитстона.

Катарометр имеет две камеры: через одну пропускают газ-носитель, через другую — газ, выходящий из колонки. Если состав газа в сравнительной и измерительной, или рабочей, камерах одинаковый, то самописец фиксирует нулевую линию. При изменении состава газового потока, поступающего в измерительную камеру, изменяется температура чувствительного элемента, что приводит к изменению его сопротивления и величины силы тока в цепи, содержащей чувствительный элемент.



**Рис. 2.4.** Схема катарометра:

1 — корпус; 2, 3 — вход и выход газа-носителя; 4 — чувствительные элементы; 5 — измерительная камера; 6 — сравнительная камера

В качестве газа-носителя при работе с катарометрами применяют водород или гелий, потому что их теплопроводность в 6–10 раз больше теплопроводности большинства органических соединений. Теплопроводность азота и диоксида углерода близка к теплопроводности большинства органических соединений, поэтому применение таких газов-носителей малоэффективно.

В связи с тем что для каждого из разделяемых соединений характерны индивидуальные значения теплоемкости и теплопрово-

дности, величина сигнала детектора при использовании одного и того же газа-носителя будет разной для одинаковых концентраций. Поэтому при количественных определениях величины площадей хроматографических пиков разделяемых компонентов умножают на значения специфических поправочных коэффициентов, которые устанавливают экспериментально.

При работе с ДТП используют *весовые поправочные коэффициенты* ( $f_{mi}$ , табл. 2.8), которые рассчитывают исходя из величин относительных молярных поправочных коэффициентов ( $f_{Mi}$ ):

$$f_{mi} = f_{Mi} (M_i / M_b), \quad (2.10)$$

где  $M_i$  и  $M_b$  — молекулярная масса соответственно исследуемого соединения и 1,3-дифенилбензола.

Величины *относительных молярных поправочных коэффициентов* определяют как отношение площадей хроматографических пиков определяемого вещества и 1,3-дифенилбензола при их равных молярных концентрациях. Для 1,3-дифенилбензола величина относительного поправочного коэффициента принимается равной единице.

Таблица 2.8

### Значения весовых поправочных коэффициентов (ВПК)

Вещество	ВПК	Вещество	ВПК
1,3-дифенилбензол	1,00	Ацетон	0,68
Тетрадекан	0,85	Метанол	0,64
Кислород	0,80	Этан	0,59
Бензол	0,78	Вода	0,55
Этанол	0,72	Метан	0,45
Гептан	0,70	Аммиак	0,42

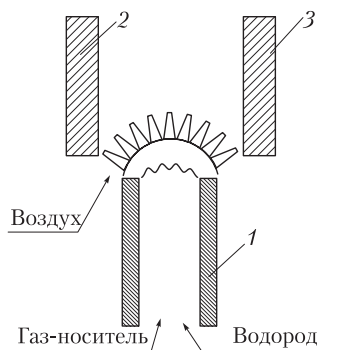
Следует иметь в виду, что значения поправочных коэффициентов значительно зависят от некоторых факторов, например от геометрии детектора и существующих в нем аэродинамических условий.

Детекторы по теплопроводности надежные в работе и недорогие. Это универсальные детекторы, которые характеризуются высокой линейностью в области больших концентраций, хорошей воспроизводимостью, стабильностью работы и показаний, но они малоселективны и менее чувствительны по сравнению с другими детекторами.

Различие конструкций детекторов по теплопроводности связано как с устройством камер детектора, так и с расположением чувствительных элементов.

Для получения высокой чувствительности важное значение имеют электрическая и механическая стабильность работы, а также точность поддержания температуры детектора, давления и расхода газа-носителя через детектор.

**Пламенно-ионизационный детектор.** Впервые ПИД предложен и описан в 1958 г. Под действием различных источников ионизации на поступающее в детектор анализируемое вещество возникают положительные или отрицательные ионы. Для ионизации пробы, выходящей из хроматографической колонки, в ПИД используется водородное пламя (рис. 2.5).



**Рис. 2.5.** Схема пламенно-ионизационного детектора:

1 — горелка; 2, 3 — электроды

Горелки ПИД изготавливаются из материала (никель, кварц и др.), который обладает термической и химической стабильностью и не плавится при температуре водородного пламени.

Детекторы пламенно-ионизационные устойчивы при высоких температурах (выше 500 °С). Изоляторы обычно изготавливают из керамики и размещают в наиболее горячей части детектора.

В работе ПИД используют три газа: водород, воздух и газ-носитель (азот или гелий). Газ-носитель смешивают с водородом и подают к соплу горелки. Водород и воздух необходимы для горения.

Применяемые газы не должны содержать примесей органических и неорганических веществ. Нужная температура пламени обеспечивается определенным соотношением газа-носителя и водорода. При недостатке воздуха происходит неполное сгорание и чувствительность детектора уменьшается. Увеличение шумов детектора связано с большим избытком воздуха.

Контроль за пламенем производится визуально с помощью зеркала. Появление капельки воды на зеркальной поверхности при поднесении палочки с зеркалом на конце к выходу детектора указывает на наличие пламени.

ПИД чувствителен к соединениям, содержащим связи С–С или С–Н, и нечувствителен к таким соединениям, как  $\text{CS}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_x$ ,  $\text{HCOOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SiCl}_4$ ,  $\text{SiF}_4$ . Это отличает ПИД от большинства других детекторов и дает ему преимущества при определении загрязнений в воздухе и анализе водных смесей (спиртные напитки, биологические и пищевые экстракты).

При пиролизе большинства органических соединений в пламени горелки образуются промежуточные ионные соединения, которые собирают в пучок, что дает возможность измерить ток ионизации.

ПИД дороже и сложнее катарометра, но является наиболее линейным детектором в газовой хроматографии; линейный диапазон детектирования  $10^6$ – $10^7$ . ПИД особенно пригоден для определения следовых количеств веществ.

**Детектор термоионный.** В 1940 г. при исследовании явлений термоэлектронной эмиссии было обнаружено, что платина при нагревании излучает положительные ионы. Это явление связано с присутствием на аноде солей щелочных металлов. В 1960 г. был разработан детектор, чувствительный к галогенсодержащим соединениям. Сейчас установлено, что основные процессы происходят в пламени, а источником атомов щелочного металла является соль.

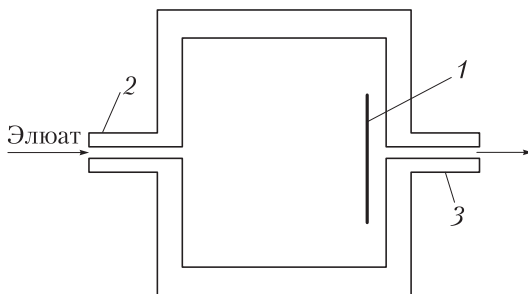
ДТИ представляет собой комбинацию пламенно-ионизационного детектора и генератора аэрозоля соли щелочного металла (например,  $\text{CsBr}$ ,  $\text{KBr}$ ,  $\text{Rb}_2\text{SO}_4$ ). В термостатируемой камере (температура около  $500^\circ\text{C}$ ) происходит испарение соли щелочного металла, образующаяся при этом аэрозоль с помощью конусного сопла вводится в пламя горелки детектора.

Предложен ДТИ с двумя горелками, помещаемыми одна над другой. На платиновую сетку, разделяющую горелки, нанесена соль или гидроксид щелочного металла. В нижней горелке сгорает проба, образующиеся при этом вещества способствуют испарению щелочного металла, находящегося на поверхности платиновой сетки. Такая двухпламенная система детектирования полностью нечувствительна к соединениям, которые не содержат фосфор и галогены, так как они сгорают в нижнем пламени.

Недостаток этой системы — постепенное уменьшение чувствительности из-за расходования соли щелочного металла, что требует проведения частой регенерации и уточнения калибровочных характеристик детектора.

Термоионный детектор применяют для анализа соединений, содержащих атомы фосфора, азота, хлора, брома и иода. К таким соединениям относятся хлорированные и фосфорсодержащие пестициды и некоторые биологически активные соединения. Применение ДТИ для детектирования азотсодержащих соединений позволило увеличить чувствительность их определения по сравнению с ПИД на 2–3 порядка. Чувствительность ДТИ к галогенсодержащим соединениям в 100–600 раз ниже, чем к фосфорсодержащим, но на порядок выше чувствительности ПИД.

**Детектор электронного захвата.** Принцип работы ДЭЗ основан на захвате электронов молекулами соединений, обладающими достаточным сродством к электрону, и образовании отрицательных молекулярных ионов (рис. 2.6).



**Рис. 2.6.** Схема детектора электронного захвата:  
1 — источник радиоактивного излучения; 2 — анод; 3 — катод

В камере детектора находится источник  $\beta$ -излучения. При прохождении газа-носителя через камеру происходит ионизация атомов газа-носителя и образование свободных электронов, которые захватываются молекулами анализируемых веществ. Образующиеся молекулярные анионы менее подвижны, чем свободные электроны, поэтому сила тока ионизации понижается и на хроматограмме появляется отрицательный пик.

Такой детектор чувствителен к соединениям, содержащим азот, галогены, свинец. В качестве газа-носителя применяют азот и водород (возбужденные атомы аргона могут вызывать побочные процессы). Чувствительность ДЭЗ определяется сродством анализируемых веществ к электрону.

Легко захватывают электроны кислород и галогены. При этом образуются стабильные отрицательные ионы. Углеводороды не захватывают свободных электронов, так как углерод и водород имеют очень малое сродство к электрону.

Линейный диапазон детектирования ДЭЗ —  $10^2$ — $10^4$  в зависимости от типа детектора.

Детекторы электронного захвата применяют при определении пестицидов и других токсичных соединений в биологических жидкостях, пищевых продуктах. Разработаны методики определения летучих алкилгалогенидов и некоторых металлоорганических и неорганических соединений в различных пробах.

Абсолютный рекорд по чувствительности, равный  $1,6 \cdot 10^{-19}$  моль для N,N'-дипентафторбензоилпентафторанилина, пока принадлежит детектору электронного захвата.

К основным недостаткам ДЭЗ относятся: чувствительность к изменению температуры, малая линейная область детектирования, сравнительно невысокий верхний температурный предел использования, возможность протекания побочных процессов.

## 2.9. Качественный анализ

Хроматографический качественный анализ основан на использовании качественных характеристик разделяемых веществ: времени удерживания или удерживаемого объема и индексов удерживания. На время удерживания и удерживаемый объем значитель-

ное влияние оказывают случайные факторы, которые в меньшей степени влияют на *относительное время удерживания* ( $t_{\text{отн}}$ ) и на *относительный удерживаемый объем* [см. формулу (1.8)]:

$$t_{\text{отн}} = t'_R / t'_{\text{ст}}$$

где  $t'_R$  — исправленное время определяемого вещества;  $t'_{\text{ст}}$  — исправленное время и объем удерживания стандарта.

Значения относительных удерживаемых объемов приводятся в справочных таблицах. Идентификация анализируемых веществ производится сравнением экспериментальных и табличных данных. При этом условия опыта не должны отличаться от тех, в которых получены табличные данные.

Основными условиями, которые необходимо соблюдать при идентификации веществ по параметрам удерживания, являются: тип сорбента, температурные режимы, параметры колонки и условия ее подготовки, объем вводимой пробы, расход газа-носителя, способ измерения мертвого времени.

Источниками погрешностей могут быть: температурные колебания термостатируемых зон хроматографа, невоспроизводимость характеристик сорбента, старение колонки, флуктуации расхода газа-носителя, погрешности дозирования, несинхронность операций ввода пробы и пуска средств измерения времени удерживания, погрешности средств измерения времени удерживания и др.

Литературные и экспериментальные данные имеют определенную погрешность и при сравнении результатов трудно говорить об их правильности, так как неизвестно истинное значение измеряемого параметра.

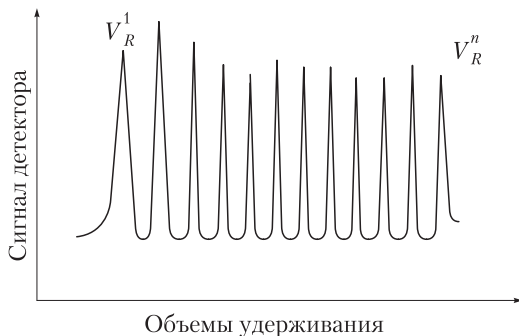
При несовпадении значения найденного параметра удерживания определяемого компонента с опубликованным не следует думать, что это разные вещества. Однако и совпадение литературных и экспериментальных параметров удерживания еще не означает, что определяемое вещество и есть вещество, известное по литературным данным. Однозначный ответ можно получить только при совпадении параметров удерживания определяемого и известного вещества на нескольких колонках различной природы.

Необходимо иметь в виду, что в качественном хроматографическом анализе многокомпонентных смесей пиковая емкость колонки ограничена.

**Пиковая емкость** — это число пиков, которые могут быть разрешены за определенный промежуток времени:

$$n = 1 + (\sqrt{N}/4) \ln(V_R^n / V_R^1), \quad (2.11)$$

где  $V_R^1$  и  $V_R^n$  — объемы удерживания первого и последнего пиков;  $N$  — число теоретических тарелок (рис. 2.7).



**Рис. 2.7.** Определение пиковой емкости

Хроматографическим приемом качественного анализа является и **метод метки**, или **метод добавки**. Получают хроматограммы анализируемого образца (хроматограмма 1) и образца с добавкой стандарта определяемого вещества (хроматограмма 2); количество добавляемого вещества не должно превышать количество идентифицируемого компонента. Если на хроматограмме 2 появился новый пик, то добавленного вещества в анализируемом образце нет. Увеличение высоты соответствующего пика на хроматограмме 2 при неизменной ширине пика у основания позволяет предполагать, что добавляемое вещество в анализируемом образце имеется. Если наблюдается одновременное увеличение высоты и изменение ширины пика у основания, то добавляемое соединение относится к другому классу соединений. В этом случае повторяют исследования на нескольких колонках с различной полярностью.

Газовая хроматография позволяет проводить как индивидуальную, так и групповую идентификацию веществ. **Групповая идентификация** осуществляется следующими способами: реакционная газовая хроматография, анализ на колонках с селективными неподвижными фазами и анализ с применением селективных детекторов.



Качественный анализ весьма сложных объектов возможен при сочетании химических и хроматографических методов исследования. При этом в результате химических реакций получают более летучие и устойчивые соединения, отличающиеся от соединений, присутствующих в пробе.

Методом реакционной газовой хроматографии часто определяют микроколичества воды: продукты реакции воды с гидридами металлов, карбидом кальция (водород, ацетилен) легко детектируются ПИД (к воде детектор малочувствителен).

Реакции обмена, дегидратации, гидролиза, гидрирования, обмена, дегидрирования, пиролиза, этерификации и другие могут проводиться до колонки, непосредственно в колонке или после колонки.

Недостатки реакционной газовой хроматографии — появление новых источников ошибок и длительность анализа.

При анализе с применением селективных детекторов сочетание универсальных детекторов (ДТП, ПИД) с селективными (ДТИ, ДЭЗ) повышает эффективность групповой идентификации компонентов смесей. Возможны различные варианты сочетания последовательного и параллельного размещения детекторов относительно друг друга. По схеме последовательного соединения все детекторы, кроме исходного, должны быть неdestructивными. Такие схемы размещения детекторов называют мультidetекторными.

В газовой хроматографии для идентификации веществ наряду с относительными параметрами удерживания используют **логарифмический индекс ( $J$ ) удерживания**, или **индекс Ковача** (предложенный в 1958 г. Е. Ковачем).

Значения индексов Ковача не зависят от условий хроматографического разделения и равны произведению числа атомов углерода в молекуле на 100 (например, для метана  $J = 100$ , для этана — 200 и т.д.).

В строго определенных условиях хроматографического разделения (тип насадки, температурные режимы колонки и системы ввода пробы, объем вводимой пробы, входное и выходное давление газа-носителя и др.) определяют значения логарифмов исправленных объемов удерживания членов гомологического ряда нормальных углеводородов, которые элюируются из колонки до и после анализируемого соединения и строят график зависимости  $\lg V_R'$  — индекс удерживания Ковача. Затем определяют величину  $\lg V_R$  исследуемого вещества и по графику определяют соответству-

ющее значение величины индекса удерживания определяемого вещества. Качественный состав анализируемой пробы устанавливают путем сравнения полученных значений индексов удерживания с табличными значениями для индивидуальных веществ.

Индекс Ковача можно рассчитать. Для этого определяют время удерживания анализируемого соединения и двух  $n$ -алканов, которые элюируются до и после определяемого соединения ( $t_n < t_i < t_{n+1}$ ). После определения времени удерживания несорбирующегося компонента рассчитывают исправленные времена удерживания определяемого вещества и  $n$ -алканов и величину индекса Ковача:

$$J = 100n + 100 \left[ \lg(t'_i / t'_n) \right] / \left[ \lg(t'_{n+1} / t'_n) \right]. \quad (2.12)$$

Индекс Ковача и логарифм исправленного времени удерживания связаны линейной зависимостью с числом атомов углерода у членов гомологического ряда.

М.С. Вигдергауз предложил вместо логарифмического рассчитывать *линейный (нормальный) индекс удерживания ( $j$ )*:

$$j = (t'_i - t'_n) / (t'_{n+1} - t'_n), \quad (2.13)$$

где  $t'$  — исправленное (приведенное) время удерживания;  $n$  — число атомов углерода в молекуле алкана;  $i$  — определяемое вещество.

Индекс удерживания является более индивидуальной характеристикой, чем удерживаемый объем, что повышает надежность идентификации.

Методом газовой хроматографии возможно **определение металлов** после переведения их в летучие соединения (хелаты). Разработаны методики определения бериллия, алюминия, хрома и других металлов с  $\beta$ -дикетонами. Хроматографические свойства  $\beta$ -дикетонатов улучшаются при использовании фторированных  $\beta$ -дикетонов, так как образуются более прочные связи. Добавление определенного количества лиганда в газ-носитель предотвращает разложение  $\beta$ -дикетонатов.

Газовую хроматографию проводят как при постоянной температуре (изотермическая ГХ), так и с программируемой температурой. В изотермической ГХ температура в колонке в процессе работы поддерживается постоянной. Однако, если температуры кипения разделяемых соединений значительно (более 100 °C) различаются, то возникает много проблем (размытые пики, увеличивает-

ся время анализа и др.). Использование ГХ с программируемой температурой эти проблемы легко решает. Легколетучие компоненты разделяются при более низкой температуре. Затем при повышении температуры разделяются компоненты с более высокими температурами кипения.

## 2.10. Количественный анализ

В основе количественного хроматографического анализа лежит зависимость различных хроматографических параметров (высота и площадь хроматографического пика, произведение высоты пика на отрезок нулевой линии, соответствующей времени удерживания) от концентрации анализируемых веществ.

Высота пика может быть определяющим фактором при достаточной стабильности условий хроматографирования (температура колонки и расход газа-носителя стабильны, измерения проводят в линейном динамическом диапазоне детектора, колонка практически не перегружена).

Необходимыми условиями количественного анализа с использованием площади пика являются стабильный расход газа-носителя и измерение сигнала детектора в линейном диапазоне. Площадь хроматографического пика определяют различными способами в зависимости от его формы: умножением высоты пика на ширину пика на половине высоты; при помощи интегратора; взвешиванием вырезанных пиков; по площади треугольника, основание которого равно расстоянию между точками пересечения касательных к сторонам пика в точках перегиба с нулевой линией. Если форма пика приближается к трапеции (пик растянут), то площадь рассчитывают как произведение полусуммы оснований трапеции на высоту. Если пики имеют форму гауссовой кривой, то определяющим параметром может быть произведение  $t_R h$ .

В случае неполного разделения пиков площадь пика ( $S$ ) рассчитывают по формуле

$$S = Kh\omega_{0,5; 0,75; 0,882; 0,9}, \quad (2.14)$$

где  $K$  — поправочный коэффициент, рассчитанный при измерении ширины пика на высотах, указанных нижними индексами при  $\omega$ ,  $K$  соответственно равно 1,065; 1,66; 2,507; 2,73.

Основными методами количественной оценки хроматограмм являются: метод нормировки, метод внутреннего стандарта и метод градуировочного графика.

В **методе нормировки** (внутренней нормализации) сумму хроматографических параметров (площадей или высот пиков) принимают за 100 %. Массовую долю ( $\omega_i$ , %) определяемого компонента рассчитывают как отношение высоты или площади одного пика ( $S_i$ ) к сумме высот или площадей всех пиков:

$$\omega_i = \frac{S_i}{\sum S} \cdot 100 \%. \quad (2.15)$$

В связи с различной чувствительностью детектора к компонентам пробы предварительно для каждого компонента рассчитывают калибровочные (поправочные) коэффициенты: к площадям ( $K_{Si}$ ) или к высотам ( $K_{hi}$ ) пиков. Определение поправочных коэффициентов проводится при последовательном хроматографировании серии бинарных смесей, составленных из определяемого компонента ( $i$ ) и стандарта (ст):

$$K_{Si} = (S_{\text{ст}} C_i) / (S_i C_{\text{ст}}), \quad (2.16)$$

$$K_{hi} = (h_{\text{ст}} C_i) / (h_i C_{\text{ст}}). \quad (2.17)$$

Формула для расчета массовой доли определяемого компонента с учетом поправочных коэффициентов:

$$\omega_i = \frac{K_{Si} S_i}{\sum_{i=1}^n K_{Si} S_i} \cdot 100 \%. \quad (2.18)$$

Достоинство метода нормировки заключается в том, что искажения, имеющиеся у всех пиков, не влияют на точность результатов. Погрешности метода связаны с постепенным изменением режима в процессе выполнения анализа.

В **методе внутреннего стандарта**, предложенном М. Реем в 1954 г., к известному количеству анализируемой пробы прибавляют известное количество не содержащегося в нем стандартного вещества.

К веществу, используемому в качестве внутреннего стандарта, предъявляются следующие требования:

- инертность по отношению к компонентам анализируемой смеси;
- стандартное вещество должно полностью смешиваться с компонентами анализируемой смеси;
- близость пиков стандартного и определяемых веществ;
- близость структуры и физико-химических свойств стандартного и определяемых веществ;
- близкое к единице отношение параметров пиков стандарта и определяемого вещества.

Массовую долю определяемого компонента рассчитывают по формуле:

$$\omega_i = \frac{K_{st} S_i r}{K_{ст} S_{ст}} \cdot 100 \%, \quad (2.19)$$

где  $K_{ст} S_{ст}$  — калибровочный (поправочный) коэффициент и площадь пика внутреннего стандарта;  $r$  — отношение массы внутреннего стандарта к массе анализируемой пробы.

В **методе градуировочного графика** (или методе абсолютной калибровки) строят график зависимости высоты или площади пика от содержания определяемого вещества в пробе.

Расчет массовой доли  $i$ -го компонента (в %) и концентрации (в г/л):

$$\omega_i = \frac{g_i}{a} \cdot 100 \% = \frac{A_s S_i}{a} \cdot 100 \%, \quad (2.20)$$

$$C_i = \frac{1000 g_i}{V_i}, \quad (2.21)$$

где  $g_i$  — содержание  $i$ -го компонента, найденное по градуировочному графику;  $a$  — масса пробы;  $A_s = g_i/S_i$  — угловой калибровочный коэффициент;  $V_i$  — объем пробы.

Необходимыми условиями работы по методу градуировочного графика являются: точность и воспроизводимость дозирования пробы, соблюдение постоянства режима хроматографирования при калибровке прибора и при выполнении анализа пробы. Это простой и наиболее точный метод, применяют его при определении одного или нескольких компонентов смеси.

Источниками систематических погрешностей в количественном хроматографическом анализе являются: отбор пробы и ее неомогенность; нелинейность и различная чувствительность детектора к компонентам пробы; обработка хроматограмм.

## **ЖИДКОСТНАЯ КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ**

### **3.1. Общая характеристика**

В методах жидкостной хроматографии (ЖХ) подвижной фазой является жидкость. Классификация методов жидкостной хроматографии проводится по восьми основным признакам: агрегатное состояние фаз хроматографической системы; способ перемещения сорбата; конфигурация разделяющей системы; относительная полярность подвижной и неподвижной фаз; механизм разделения веществ; цели и задачи анализа; химическое превращение сорбата; способ детектирования.

В зависимости от агрегатного состояния фаз различают:

- жидкостную адсорбционную;
- жидко-жидкостную;
- противоточную жидкостную хроматографию.

По способу перемещения сорбата выделяют следующие виды жидкостной хроматографии:

- вытеснительную;
- фронтальную;
- элюентную;
- изократическую;
- градиентную;
- с программированием температуры, давления и скорости потока элюента.

В зависимости от конфигурации разделяющей системы выделяют хроматографии:

- планарную — тонкослойную и бумажную;
- колоночную;
- микроколоночную;
- многоколоночную;
- циркуляционную;

- многомерную;
- перколяционную.

По относительной полярности подвижной и неподвижной фаз различают:

- нормально-фазовую хроматографию (НФХ);
- обращенно-фазовую хроматографию (ОФХ).

По механизму разделения веществ выделяют следующие виды жидкостной хроматографии:

- адсорбционную;
- распределительную;
- эксклюзионную;
- аффинную;
- лигандообменную;
- ионообменную и др.

В зависимости от химического превращения сорбата различают:

- реакцию хроматографию;
- осадочную хроматографию.

Хроматографические методы, сочетающие разделение компонентов смеси с прямым детектированием веществ, разделяют по способу детектирования:

- на спектрофотометрические;
- рефрактометрические;
- флуориметрические;
- хемилюминесцентные;
- электрохимические и др.

Основные особенности жидкостной хроматографии следующие:

- метод ЖХ позволяет анализировать смеси почти всех растворимых веществ, в том числе и тех, которые не могут быть проанализированы методом газовой хроматографии;
- для оптимизации условий разделения веществ учитывают взаимодействия молекул разделяемых веществ не только с неподвижной фазой, но и с подвижной;
- разделение веществ происходит при низких температурах (в отличие от ГХ), что иногда повышает эффективность разделения.

*Качественный анализ* смеси методом ЖХ проводят аналогично идентификации компонентов смеси методом газовой хроматогра-

фии, т.е. определяют времена или объемы удерживания и рассчитывают относительное время удерживания.

*Количественное определение* компонентов смеси основано на пропорциональной зависимости высоты пика или его площади от количества хроматографируемого компонента. Основные методы определения количественного состава смесей — метод градуировочного графика и метод внутреннего стандарта. В жидкостной хроматографии метод нормировки используется редко, так как в этом методе нет детектора (подобного катарометру в ГХ), обладающего общей чувствительностью к соединениям различной химической природы.

В современных хроматографах пики обрабатываются с помощью компьютеров и исследователь (аналитик) получает нужные параметры: название веществ, времена удерживания, площади пиков и содержание компонентов анализируемого образца, в печатном виде.

Отличие теоретических положений ЖХ от газовой хроматографии состоит в том, что плотность жидкостей (в  $10^3$  раз) и вязкость (в  $10^2$  раз) больше, чем у газов, а коэффициенты диффузии меньше (в  $10^4$  раз), поэтому процесс массообмена при ЖХ идет медленнее.

Основное влияние на ширину хроматографической полосы оказывает вихревая диффузия и массопередача, которые существенно зависят от диаметра частиц неподвижной фазы.

Уравнение Ван-Деемтера [см. 1.3, формула (1.26)] с определенными дополнениями применимо и к жидкостной хроматографии. Коэффициент  $A$ , отражающий вклад вихревой диффузии в размывание зоны, в приложении к жидкостной хроматографии принимает вид:

$$A = d_p U^\beta,$$

где  $d_p$  — средний диаметр частиц сорбента;  $U$  — скорость подвижной фазы;  $\beta$  — коэффициент (определяется из опытных данных).

Продольная диффузия в жидкостной хроматографии незначительно влияет на размывание полосы. Вклад продольной диффузии большинства исследуемых соединений в подвижном растворителе в общую высоту тарелки равен примерно  $10^{-3}$  см.



Третье слагаемое в уравнении Ван-Деемтера отражает вклад процессов массопередачи и кинетики сорбции–десорбции в размывание зоны:

$$CU = \left( \frac{grd^2}{D_s} + \frac{wd_p^2}{D_m} \right) U, \quad (3.1)$$

где  $g$  — коэффициент, зависящий от геометрии каналов;  $r$  — константа, зависящая от относительной скорости перемещения подвижной фазы и растворенного вещества;  $d$  — длина диффузионного пробега молекулы в неподвижной фазе;  $w$  — коэффициент, зависящий от структуры сорбента и геометрии колонки;  $d_p$  — диаметр частиц сорбента;  $D_m$ ,  $D_s$  — коэффициент диффузии вещества соответственно в подвижной и неподвижной фазах.

Полное уравнение Ван-Деемтера для жидкостной хроматографии имеет вид:

$$H = d_p U^\beta + \frac{2\gamma D_m}{U} + \left( \frac{grd^2}{D_s} + \frac{wd_p^2}{D_m} \right) U. \quad (3.2)$$

Коэффициент  $C$  является очень важным для высокоэффективной ЖХ, так как зависит от скорости массообмена между подвижной и неподвижной фазами. Величина  $C$  зависит от внутренних свойств сорбента (размера и формы пор и др.).

*Основные принципы, на которых основано разделение* в жидкостной хроматографии, следующие: адсорбция, распределение, ионный обмен, эксклюзия. Разделение компонентов смеси обычно осуществляется по нескольким механизмам одновременно.

Жидкостная хроматография по конструктивным особенностям подразделяется на открытые и замкнутые системы (ВЭЖХ).

Классическая ЖХ в стеклянных колонках при нормальном давлении, предложенная М.С. Цветом, сейчас используется в препаративных целях для предварительного разделения и демонстрационных экспериментов. В настоящее время широко применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) — скоростная жидкостная хроматография, которая является современной формой реализации классической жидкостной колоночной хроматографии. Высокая эффективность скоростной жидкостной хроматографии обеспечивается применением частиц сорбента с диаметром 3–10 мкм и высокого давления. Уменьшение размера

частиц сорбента снижает высоту теоретической тарелки и, соответственно, повышает эффективность разделения.

ВЭЖХ используется для разделения и определения молекул (жидкостная адсорбционная и жидкостная распределительная хроматография), для разделения макромолекул (гель-хроматография), для разделения и определения ионов (ионообменная, ионная и ион-парная хроматография).

Основные теоретические положения классической колоночной ЖХ и ВЭЖХ практически одинаковы.

Далее рассмотрены основы и аналитические возможности важнейших методов жидкостной колоночной хроматографии (адсорбционная, распределительная, ионообменная, ионная, ион-парная, лигандообменная, эксклюзионная, аффинная) и планарной хроматографии (см. гл. 4).

Определения некоторых других хроматографических методов даны в словаре основных терминов.

## 3.2. Жидкостная адсорбционная хроматография

**Жидкостная адсорбционная хроматография** (ЖАХ) — это метод жидкостной хроматографии, в котором неподвижной фазой является твердое вещество, а элементарным актом взаимодействия анализируемого вещества (сорбата) с твердой фазой (сорбентом) — акт адсорбции.

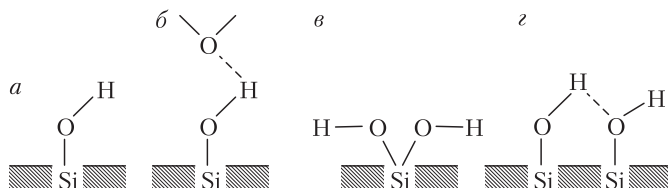
### 3.2.1. Варианты жидкостной адсорбционной хроматографии

В зависимости от полярности подвижной и неподвижной фаз различают два варианта адсорбционной жидкостной хроматографии: нормально-фазовый и обращенно-фазовый. Если применяют полярные сорбенты (силикагель, оксид алюминия) и неполярные подвижные фазы (например, гексан), то это нормально-фазовый вариант.

Методом *нормально-фазовой адсорбционной хроматографии* разделяют многие полярные вещества. При выборе растворителя учитывают его полярность: с увеличением полярности растворителя элюирующая способность возрастает.

Основные преимущества силикагеля, обычно применяемого в качестве сорбента, — относительная инертность, большая адсорб-

сионная емкость, легко поддается модификации. Силикагель  $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  имеет аморфную структуру, на его поверхности находится несколько типов беспорядочно распределенных силанольных OH-групп (рис. 3.1).



**Рис. 3.1.** Типы OH-групп на поверхности силикагеля:

*a* — свободная; *б* — связанная; *в* — геминальная;

*г* — реакционноспособная



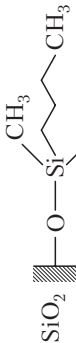
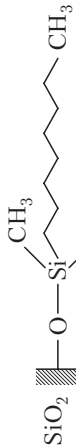

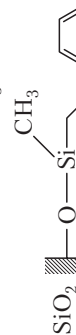
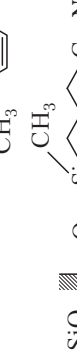
Введение различных функциональных групп ( $-\text{CN}$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) позволяет изменить свойства и селективность силикагелей. При применении нормально-фазовой хроматографии достигается высокая селективность разделения пространственных изомеров (*орто*-, *мета*- и *пара*-изомеров ароматических соединений).

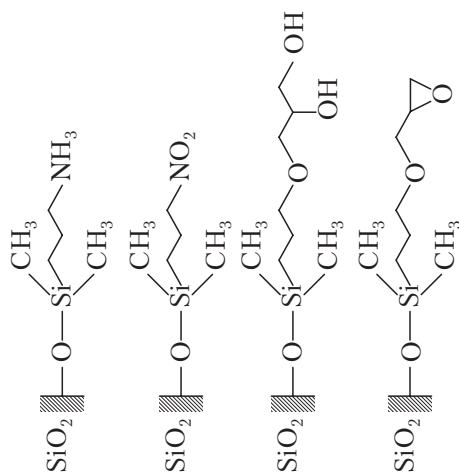
В *обращенно-фазовой адсорбционной хроматографии* применяют полярные подвижные фазы и неполярные сорбенты. Название метода предложено в 1950 г. У. Говардом и А. Мартином. В этом методе обычную полярность подвижной и неподвижной фаз изменяют на противоположную. Под термином «хроматография с обращенными фазами» понимают использование в хроматографическом процессе менее полярных, чем растворитель, неподвижных фаз. Например, было замечено, что при замене силикагеля (полярный сорбент) и толуола (менее полярный растворитель) на уголь (неполярный сорбент) и воду (полярный растворитель) последовательность элюирования смеси жирных кислот меняется.

Соединения с неполярными группами сорбируются на неполярном сорбенте. В качестве подвижной фазы применяют сильно-полярные растворители (вода, ацетонитрил или смеси воды со спиртами). Гидрофобным неполярным сорбентом является химически модифицированный хлорсиланом  $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$  силикагель, который вместо гидроксильных групп содержит эфирную силильную группу (табл. 3.1).

Таблица 3.1

## Структурные формулы некоторых модифицированных силикагелей

Название	Структурная формула
Немодифицированный силикагель	
Силикагель C1	
Силикагель C4	
Силикагель C8	
Силикагель C18 (ОДС)	
Фенилсиликагель (Ph)	
Нитрилсиликагель (CN)	

Аминосиликагель (NH<sub>2</sub>)Нитросиликагель (NO<sub>2</sub>)

Диолсиликагель

Эпоксисиликагель

Такие сорбенты относят к химически привитым. В зависимости от природы органического радикала получены разные сорбенты: метилсиликагель (силикагель  $C_1$ ) обычно применяют в обращенно-фазовой хроматографии для разделения высокомолекулярных соединений; силикагель  $C_{18}$  пригоден для работы в режиме ион-парной хроматографии, обладает высокой селективностью по отношению к гомологам; аминосиликагель используется как в ОФХ, так и в НФХ, находит применение как слабый ионообменник для разделения кислот; нитрилсиликагель используется в системах с водными и органическими подвижными фазами, присутствие нитрильной группы изменяет селективность этого сорбента в сравнении с исходным силикагелем.

ОФХ применяется чаще, чем НФХ, поскольку сорбенты с привитыми неполярными группами имеют определенные преимущества: более устойчивы к действию растворителей, воды, изменению pH; механическая устойчивость к высоким давлениям; быстрота установления равновесия при смене элюента, возможность варьировать селективность за счет изменения степени прививки, дополнительной химической обработки. Применение градиентного элюирования (постепенного изменения состава элюента) в ОФХ позволяет элюировать из колонки как слабо-, так и сильноудерживающиеся вещества с хорошим разделением.

Адсорбционная жидкостная хроматография по эффективности не только конкурирует с газовой хроматографией, но и имеет существенные преимущества. Это высокочувствительный, селективный и экспрессный метод разделения и анализа многокомпонентных смесей в растворах.

Адсорбционная жидкостная хроматография выполняется в двух вариантах — колоночная и в тонком слое сорбента.

*Теория адсорбционной жидкостной хроматографии* базируется на теории адсорбции из многокомпонентных растворов. Адсорбция из растворов подчиняется уравнению изотермы мономолекулярной адсорбции Ленгмюра:

$$n = n_{\infty}bc/(1 + bc), \quad (3.3)$$

где  $n$  — количество адсорбированного вещества;  $n_{\infty}$  — возможное максимальное количество вещества на адсорбенте;  $c$  — концентрация;  $b$  — постоянная (константа равновесия адсорбции).

В области разбавленных растворов изотерма адсорбции линейная:

$$n = n_{\infty}bc. \quad (3.4)$$

Область линейной адсорбции называют областью Генри.

Связь величины ВЭТГ со скоростью подвижной фазы  $U$  выражается уравнением

$$H = 2R_A(1 - R_A)Ut_s, \quad (3.5)$$

где  $R_A = t_m/(t_m + t_s)$ ,  $t_m$  — среднее время между десорбцией и повторной адсорбцией молекулы вещества;  $t_s$  — среднее время пребывания молекулы в неподвижной фазе.

Время, необходимое для адсорбции и десорбции вещества, связано с глубиной пор сорбента ( $d$ ) и коэффициентом диффузии ( $D$ ) уравнением Эйнштейна:

$$d^2 = 2Dt_s. \quad (3.6)$$

После подстановки уравнения (3.6) в уравнение (3.5) получим

$$H = R_A(1 - R_A)Ud^2/D. \quad (3.7)$$

С увеличением  $d$  увеличивается значение  $H$  и соответственно уменьшается эффективность колонки, поэтому большая глубина пор адсорбента является одной из основных причин низкой эффективности.

Силы взаимодействия молекул сорбата и сорбента определяют селективность сорбента. Различают три вида таких сил.

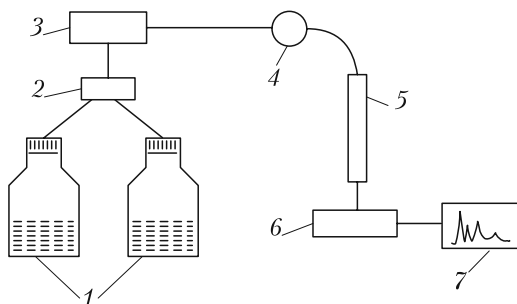
Для лондоновских дисперсионных сил не предполагается образование химических связей. Результатом действия таких сил является физическая адсорбция (низкие значения энергии, быстрое установление равновесия). Например, адсорбция на неполярном адсорбенте (графитированная сажа) обусловлена дисперсионным взаимодействием.

Примером проявления индукционных сил можно считать адсорбцию на оксиде алюминия. В результате поляризации электронов соседних атомов или молекул в постоянном электрическом поле появляется индуцированный дипольный момент.

В адсорбции существенное значение имеют специфические силы, например водородные связи. Наличие на поверхности адсорбента гидроксильных групп делает такой адсорбент специфичным по отношению к таким соединениям, как эфиры и нитрилы.

### 3.2.2. Жидкостный хроматограф

Для проведения жидкостной адсорбционной хроматографии используют жидкостный хроматограф, который является более сложным прибором по сравнению с газовым хроматографом. Он включает несколько дополнительных узлов: насосы и измерители давления, систему дегазации, устройство для создания градиента (рис. 3.2).



**Рис. 3.2.** Схема жидкостного хроматографа:

1 — емкости для растворителей; 2 — смесительная камера; 3 — насос; 4 — инжектор; 5 — колонка; 6 — детектор; 7 — регистрационная система

*Насосы для ЖХ* должны обеспечивать постоянную подачу растворителя в колонку и создавать давление до нескольких мегапаскалей. Они должны удовлетворять следующим основным требованиям:

- химическая инертность материалов к подвижной фазе;
- достаточно высокое рабочее давление;
- высокая стабильность скорости потока.

*Насосы, применяемые в ВЭЖХ*, делят на две группы: постоянной скорости (расхода) и постоянного давления. Для насосов постоянного давления характерны высокая производительность и отсутствие пульсации. Насос с пневмоусилителем — это наиболее совершенная конструкция насосов этого типа. Недосток насосов постоянного давления — изменение расхода подвижной фазы при изменении сопротивления системы.

К насосам постоянного расхода относятся шприцевые и возвратно-поступательные, которые наиболее широко применяются в ВЭЖХ.



Возвратно-поступательные насосы бывают поршневые (плунжерные) и мембранные (диафрагменные). Прокачивание раствора в обоих случаях происходит за счет возвратно-поступательного движения поршня или мембраны. Основным достоинством поршневых насосов является возможность изменять производительность при использовании сменных головок с разным диаметром поршня. Ассортимент возвратно-поступательных насосов, выпускаемых различными фирмами мира, весьма широк.

Работа насоса считается оптимальной, если он обеспечивает поток жидкости от 0,5 до 10 мл/мин при давлении 400–500 атм.

Применение ВЭЖХ позволяет значительно увеличить эффективность хроматографического разделения, так как используют сорбенты с размером частиц 3–10 мкм. Заданный расход элюента поддерживается насосом с высоким рабочим давлением.

Жидкостные хроматографы, в зависимости от способа элюирования, бывают изократические и градиентные. При градиентном элюировании используются два различных типа жидкостных хроматографов. В хроматографах первого типа состав подвижной фазы формируется на линии низкого давления, второго типа — на линии высокого давления.

### 3.2.3. Колонки

При выборе условий хроматографического разделения учитывают параметры колонки (длину, внутренний диаметр, материал), плотность насыпки адсорбента, скорость протекания элюента, градиент давления, температуру, объем пробы.

От длины колонки зависят эффективность и селективность колонки, а также продолжительность анализа.

С увеличением диаметра колонки повышается ее производительность, но уменьшается скорость движения подвижной фазы, происходит размывание хроматографических пиков.

Основной материал для изготовления колонок — нержавеющей сталь или толстое стекло.

От плотности заполнения колонки зависит постоянство скорости потока подвижной фазы, а разделительная способность колонки и продолжительность анализа определяются скоростью потока подвижной фазы.

Градиент давления в колонке зависит от многих факторов: вязкость подвижной фазы, длина колонки, диаметр частиц, скорость потока подвижной фазы.

Повышение температуры разделения улучшает эффективность колонок в обращенно-фазовой, ионообменной и эксклюзионной хроматографии. При стабилизации температуры повышается точность количественных определений, поэтому использование термостатов желательно, а иногда и обязательно. Для большинства работ в ВЭЖХ достаточным является диапазон термостатирования до 100 °С.

Перед подачей подвижной фазы в колонку необходима дегазация жидкости. Выделение пузырьков газа в колонке снижает ее эффективность, а при попадании пузырьков газа в детектор наблюдаются беспорядочные колебания нулевой линии.

Основные способы дегазации — нагревание или вакуумирование. Если при нагревании изменяется состав подвижной фазы, то применяют вакуумирование.

#### 3.2.4. Адсорбенты

К адсорбентам, применяемым в жидкостной адсорбционной хроматографии, предъявляются определенные требования: высокая эффективность и селективность, достаточная скорость хроматографирования (см. приложение 1). Таким требованиям отвечают поверхностно-пористые и обычные объемно-пористые сорбенты, обладающие небольшой удельной поверхностью. Поверхностно-пористые сорбенты обладают большой механической прочностью, небольшим сопротивлением потоку и хорошо регенерируются. Отсутствие в них глубоких пор снижает время пребывания вещества в подвижной фазе, находящейся в порах, и соответственно увеличивается скорость массообмена.

Сорбенты, используемые в жидкостной хроматографии, отличаются не только материалом, поверхностной модификацией, но и размерами зерен сорбента (размер зерен измеряют в мкм, нм или в меш). Величина зернения в мешах соответствует числу отверстий на дюйм самого тонкого сита, через которое может пройти зерно. Ситовые шкалы (номер сита), принятые за стандарт в разных странах, различаются (табл. 3.2).

В колоночной жидкостной хроматографии применяются сорбенты с зернением 80–200 меш (стандарт США), а в планарной (плоскостной) хроматографии >250 меш. Малый разброс в мешах указывает на однородность зерен по размерам и обеспечивает более эффективное разделение.

Таблица 3.2

**Ситовые шкалы [11]**

Размер отверстия, нм	Номер сита, меш			
	США	Великобритания	Япония	Германия, Франция
4000	5	—	—	—
2000	10	8	9,2	34
841	20	18	20	—
800	—	—	—	30
595	30	25	28	—
500	—	—	—	28
420	40	36	36	—
297	50	52	48	—
250	60	60	55	25
210	70	72	65	—
200	—	—	—	24
177	80	85	80	—
160	—	—	—	23
149	100	100	100	—
125	120	120	120	22
105	140	150	145	—
100	—	—	—	21
88	170	170	170	—
80	—	—	—	20
74	200	200	200	—
63	230	240	250	19
53	270	300	280	—
50	—	—	—	18
44	325	350	325	—
40	—	—	—	17
37	400	—	—	—

По механическим свойствам неподвижные фазы (адсорбенты) делят на мягкие, которые выдерживают давление до 0,2 мПа (изготовлены на основе целлюлозы, полистирола, полиакриламида и др.), полужесткие — до 10 мПа (на основе поливинилового спирта, полистирола) и жесткие, которые работают при давлении до 50 мПа (изготовлены из стекла, оксидов кремния, алюминия и циркония).

В жидкостной адсорбционной хроматографии применяют объемно-пористые мелкозернистые адсорбенты: силикагели, алюмогели, силикат натрия, гидроксид кальция и др.

На основе кремнезема выпускается несколько марок силихромов (силихромы 1; 2; 3; С-80; С-120) с удельной поверхностью от 30 до 120 м<sup>2</sup>/г и малым диаметром пор (30–150 нм).

В табл. 3.3 дана классификация адсорбентов для жидкостной адсорбционной хроматографии (ЖАХ).

Таблица 3.3

### Классификация адсорбентов для ЖАХ

Класс	Общая классификация	Типичные представители
I	Полярные неорганические	Силикагель, оксид алюминия, оксид магния
II	Неполярные неорганические	Графит, уголь
III	Полимерные привитые	Пропиламин, бутиронитрил, фазы, содержащие диольные группировки (–O–CH <sub>2</sub> –CHОН–CH <sub>2</sub> ОН)
IV	Неполярные органические	Привитые фазы C <sub>8</sub> , C <sub>18</sub>
V	Полярные органические	Целлюлоза, хитин, полиамид

Полярные адсорбенты (SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, силикат магния и др.) имеют на поверхности ОН-группы. Недостаток этих адсорбентов — высокая чувствительность к воде в растворителях: силоксановые группы –Si–O–Si– переходят в силанольные ≡Si–ОН, что приводит к изменению свойств поверхности.

При выборе адсорбента необходимо иметь в виду, что они обладают кислыми или основными свойствами и анализируемые вещества могут претерпевать химические превращения. Поэтому такие адсорбенты требуют определенной подготовки (модифицирова-

ния), длительного промывания водой и др. Влияние окислителей можно уменьшить при хроматографировании в среде азота.

Адсорбентами заполняют колонки, изготовленные из специальных сортов стекла (дюран, пирекс). Стандартная колонка имеет длину 250 мм, внутренний диаметр 4,6 мм и заполнена частицами размером 5 или 10 мкм. При работе с такой колонкой достигается эффективность около 50 000 теоретических тарелок на метр. В микроколоночной ВЭЖХ частицы имеют размер 3 мкм, а длина колонки — 30–75 мм при внутреннем диаметре 1 мм. Для предварительного разделения применяют короткие предколонки, заполненные более крупным сорбентом.

Применение сорбентов заводского производства и хроматографирование в строго определенных условиях улучшают воспроизводимость результатов.

При использовании в качестве неподвижной фазы силикагеля времена удерживания увеличиваются в определенной последовательности: алкены < ароматические углеводороды < галогенсодержащие соединения и сульфиды < простые эфиры < нитросоединения < сложные эфиры, спирты, амины < сульфоны < сульфоксиды < амиды < карбоновые кислоты.

Метод адсорбционной хроматографии чаще применяется для неполярных соединений, так как они малорастворимы в воде и не могут быть разделены методом распределительной жидкостной хроматографии.

Методом адсорбционной хроматографии достигается высокая эффективность при разделении стереоизомеров.

В жидкостной хроматографии используют и специальные сорбенты, например, хиральные сорбенты для разделения рацемических смесей энантиомеров, нуклеотидов и нуклеозидов, олигонуклеотидов и РНК, биополимеров и вирусов.

Для разделения энантиомеров в рацемических смесях получены сорбенты как на основе хиральных смол, так и на основе силикагеля с привитыми динитробензолпроизводными фенилглицина и лейцина и с производными нафтилаланина.

Для определения лекарственных веществ в биологических жидкостях без удаления из сыворотки пептидов выпускают бифункциональные «сорбенты Пинкертон» на основе силикагеля, внешняя поверхность которых гидрофилизирована, а внутренняя гидро-

фобизирована; привитая фаза – трипептид глицилфенилаланила. Молекулы белков не проникают внутрь глобул, а лекарственные вещества проникают внутрь пор сорбента и разделяются.

### 3.2.5. Подвижные фазы

В качестве подвижной фазы (ПФ) в колоночной жидкостной адсорбционной хроматографии применяется жидкий растворитель или смесь растворителей.

К растворителю предъявляются определенные требования:

- он должен хорошо растворять все компоненты анализируемой смеси;
- не должен взаимодействовать с определяемыми веществами, адсорбентом и кислородом воздуха;
- не должен необратимо адсорбироваться на применяемом адсорбенте;
- должен быть маловязким, доступным и не содержать примесей;
- должен обеспечивать нормальную работу применяемого детектора.
- по окончании хроматографического процесса растворитель должен полностью удалять все адсорбированные вещества с поверхности адсорбента.

**Очистка растворителей.** От свойств и качеств используемых растворителей во многом зависит работа хроматографа. К основным способам очистки растворителей относятся: фильтрование, дегазация (деаэрация), очистка от химических примесей.

Перед использованием подвижную фазу *фильтруют* через мембранный фильтр с размером пор 0,5 мкм. Наличие механических примесей в подвижной фазе сказывается на работе насоса, приводит к увеличению сопротивления колонки.

*Дегазация* (удаление газов) особенно необходима при работе с вредными элюентами. Обычно через барботер в резервуар с растворителем пропускают гелий или азот, которые увлекают за собой растворенные газы. При насыщении азотом удаляется кислород, который является причиной образования газовых пузырьков и может реагировать с подвижной фазой и сорбентом. Для дегазации используется и обработка ультразвуком.

*Очистка от химических примесей* проводится в основном двумя способами: перегонка и адсорбционное отделение примесей. В качестве адсорбентов используют оксид алюминия и силикагель с большой удельной поверхностью и размером зерна 0,1–0,5 мм. Предварительно сорбенты сушат в течение нескольких часов при 250–300 °С (оксид алюминия) и 160–180 °С (силикагель).

**Полярность растворителей.** В жидкостной хроматографии высокая селективность разделения компонентов достигается не только выбором селективного адсорбента, но и подбором системы растворителей (табл. 3.4).

Таблица 3.4

## Классификация растворителей для ЖАХ

Классификация	Общая классификация	Представители
N	Неполярные, средней полярности	Гептан, бутилхлорид, бензол, хлороформ
P	Неамфотерные полярные	Метилэтилкетон, тетрагидрофуран, этилацетат, ацетонитрил
AB	Амфотерные полярные	<i>n</i> -Пропанол, метанол, вода

В качестве критерия полярности растворителей М.С. Цвет использовал диэлектрическую проницаемость.

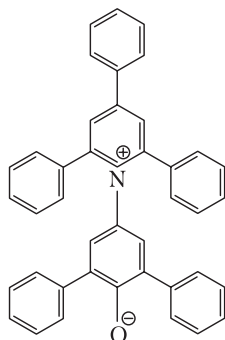
*Диэлектрическая проницаемость  $\epsilon_r$* , измерена как для индивидуальных растворителей, так и для смешанных растворителей и изменяется от -2 (алканы) до 111 (формамид). В зависимости от величины диэлектрической проницаемости различают полярные и неполярные растворители. Диэлектрическая проницаемость характеризует диссоциирующую способность растворителя, т.е. способность растворять электролиты. Однако она не позволяет описать молекулярные взаимодействия между веществом и растворителем.

*Дипольный момент ( $\mu$ )* дополняет диэлектрическую проницаемость при характеристике полярности вещества. Он определяет полярность растворителя на молекулярном уровне и характеризует электрические свойства молекулы как системы заряженных частиц.

Произведение  $\epsilon_r$  на  $\mu$  известно как электростатический коэффициент  $EF$ . В зависимости от величины  $EF$  растворители делят на четыре группы: углеводородные ( $EF = 0-7 \cdot 10^{-30}$  Кл·м), электронодонорные ( $EF = 7 \cdot 10^{-30}-70 \cdot 10^{-30}$  Кл·м), гидроксидные ( $EF = 50 \cdot 10^{-30}-170 \cdot 10^{-30}$  Кл·м) и биполярные растворители ( $EF \geq 170 \cdot 10^{-30}$  Кл·м).

В качестве критерия полярности Дж. Гильдебранд предложил использовать *параметр растворимости*  $\delta_T$ , который характеризует количество работы, затрачиваемой на отделение молекул растворителя друг от друга. Наиболее высокий параметр растворимости у воды ( $52,2 \text{ МПа}^{1/2}$ ). Значения параметров растворимости других веществ изменяются в пределах  $14-34 \text{ МПа}^{1/2}$ . Однако параметр растворимости не объясняет значительных различий свойств веществ с близкой полярностью. Например, хлористый метилен и диоксан имеют близкие значения полярности, однако хлористый метилен не растворяется в воде, а диоксан смешивается с водой в любых соотношениях.

*Сольватохромный параметр Димрота — Райхардта*  $E_T(30)$ , применяемый в хроматографии, рассчитывается на основании взаимодействия растворителя с N-феноксипиридинийбетаиновым красителем

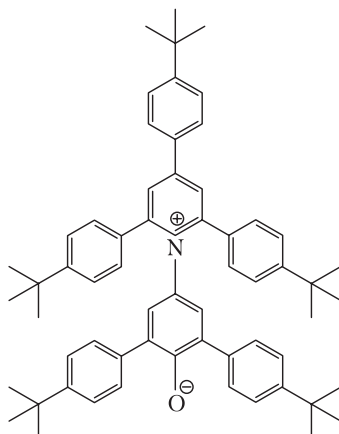


Степень полярности растворителя характеризуется энергией электронного перехода полосы переноса заряда. Более полярному растворителю соответствуют более высокие значения  $E_T(30)$ .

Сольватохромный эффект бетаинового красителя зависит от растворителя и регистрируется в широком спектральном диапазоне в видимой области спектра: красный — в метаноле, фиолето-



вый — в этаноле, зеленый — в ацетоне, голубой — в изоамиловом спирте и желто-зеленый — в анизоле. Недостаток такого красителя — малая растворимость в неполярных растворителях. Поэтому был предложен другой, более липофильный бетаиновый краситель, структура которого отличается наличием *трет*-бутильных заместителей в *пара*-положении пяти фенильных радикалов



Л. Снайдер предложил *параметр полярности*  $P'$ :

$$P' = \lg K_e' + \lg K_d' + \lg K_n', \quad (3.8)$$

где  $K_e'$ ,  $K_d'$ ,  $K_n'$  — коэффициенты распределения стандартных веществ соответственно этанола, диоксана и нитрометана между газовой фазой и исследуемым растворителем.

Высокое значение  $P'$  у воды, а низкие значения — у насыщенных углеводородов.

Значения параметра  $P'$  определены методом газовой хроматографии. Для количественной оценки полярности растворителей в жидкостной хроматографии эти значения оказались недостаточно точными.

Численные значения параметров полярности растворителей приведены в приложении 2.

**Элюирующая способность растворителей.** В адсорбционной жидкостной хроматографии элюирующая способность растворителей оценивается безразмерной величиной  $\epsilon^0$  — энергия адсорбции растворителя, отнесенная к площади адсорбента, занятой раство-

рителем. Она зависит от природы растворителя, адсорбента и других условий.

Для сравнения элюирующей способности растворителей используют значения  $\epsilon^\circ$ , определенные на оксиде алюминия и силикагеле. Между этими величинами существует зависимость:  $\epsilon^\circ(\text{SiO}_2) = 0,77 \epsilon^\circ(\text{Al}_2\text{O}_3)$ .

При работе с неорганическими адсорбентами (силикагелем, оксидом алюминия и др.) элюирующую способность растворителя оценивают по шкале Гильдебранда, в основе которой лежит энергия поляризации растворителей; энергия поляризации *n*-пентана принята за нуль.

*Элюирующая сила растворителя* показывает, во сколько раз энергия сорбции данного растворителя больше энергии сорбции растворителя-стандарта (*n*-пентан). Различают слабые и сильные элюенты-растворители: сильные хорошо адсорбируются неподвижной фазой, а слабые адсорбируются плохо.

Растворители располагают в порядке изменения (возрастания) элюирующей силы в элюотропные ряды (табл. 3.5). Хроматографические растворители располагаются между неполярными алканами и полярной водой.

Таблица 3.5

Элюотропный ряд растворителей [1]

Растворитель	Адсорбенты			Растворитель	Адсорбенты		
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SiO <sub>2</sub>	MgO		Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SiO <sub>2</sub>	MgO
<i>n</i> -Пентан	0,00	0,00	0,00	Ацетон	0,56	0,47	—
Гексан	0,01	—	—	1,4-Диоксан	0,56	0,49	—
Циклопентан	0,05	—	0,03	Тетрагидрофуран	0,57	0,38	—
Тетрахлорид-углерод	0,18	0,11	0,10	Этилацетат	0,58	—	—
Бензол	0,32	0,25	0,22	Метилацетат	0,60	0,50	0,28
Хлороформ	0,40	0,26	0,26	Ацетонитрил	0,65	—	—
Метиленхлорид	0,42	0,38	0,26	Этанол	0,88	—	—
Диэтиловый эфир	0,46	0,38	0,21	Метанол	0,95	—	—

При выборе растворителя для работы с неполярными адсорбентами (активированные угли, графитированные сажи и др.) учиты-

вают обратный порядок расположения растворителей по элюирующей способности (вода < метанол < ... < бензол).

Для повышения эффективности разделения смесей часто используют *многокомпонентные элюенты* — подвижные фазы более сложного состава, что в ряде случаев приводит к улучшению разделения. Однако применение тройных и более сложных систем растворителей не всегда оправдано, особенно если разделяемые смеси являются несложными.

Таким образом, основными характеристиками подвижных фаз являются их элюирующая способность и эффективность разделения.

При выборе элюента придерживаются определенных правил: с увеличением числа двойных связей и ОН-групп сорбция веществ увеличивается. Эмпирически установлено, что сорбция уменьшается в ряду органических соединений:

кислоты > спирты > альдегиды > кетоны > сложные эфиры >  
> углеводороды.

Применение легколетучих растворителей ( $t_{\text{кип}} < 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) приводит к невоспроизводимости величин удерживания, поскольку состав подвижной фазы в результате испарения изменяется. Высокая вязкость, характерная для менее летучих растворителей, требует использования высокого давления.

В зависимости от метода детектирования предъявляются определенные требования к растворителю. От разности коэффициентов преломления подвижной фазы и определяемых соединений зависит чувствительность рефрактометрического детектора. Понятно, что для спектрофотометрического детектора подвижная фаза должна быть прозрачна в определенной спектральной области.

Наиболее доступным растворителем является вода, однако содержащиеся в ней примеси могут проявляться в виде ложных пиков. Поэтому при выполнении, например, градиентного элюирования необходима продолжительная очистка воды в специальных системах.

Из других растворителей наиболее широко применяются метанол и ацетонитрил (в ОФХ), реже — тетрагидрофуран, этанол и диоксан (см. приложение 3). Эти растворители имеют низкую вязкость и хорошую растворяющую способность. Очистку ацетонитрила обычно проводят экстракцией примесей гексаном, а затем водно-ацетонитрильную фазу перегоняют при температуре 75–77 °С.

В НФХ в основном применяют изопропанол, диэтиловый эфир, диоксан, тетрагидрофуран, а также алкилгалогениды (чаще хлороформ).

Из алканов наибольший практический интерес представляет гексан. Малая летучесть и низкая вязкость гексана позволяет использовать его для хроматографического разделения малополярных веществ.

Высокая токсичность паров ароматических углеводородов (бензол, толуол), а также непрозрачность по отношению к УФ-свету являются основными недостатками их применения в жидкостной хроматографии.

Применение индивидуальных растворителей и их смесей в качестве подвижных фаз не всегда позволяет достичь селективного разделения анализируемых компонентов. В ряде случаев образуются асимметричные аномально уширенные зоны, появляются пики с малыми временами удерживания либо вещества не элюируются.

Для преодоления возникающих трудностей в подвижную фазу вводят в небольших количествах (от 0,01 до 2 %) специфические модификаторы, которые изменяют термодинамические характеристики системы. В качестве модификаторов используют кислоты, основания, соли. При этом изменяются ионная сила и рН системы. В присутствии ионизатора подавляется ионизация сорбата, что приводит к улучшению формы пика.

Пример использования специфических модификаторов — применение аммиака и фосфорной кислоты в ОФХ для приготовления буферных растворов. Следует иметь в виду, что в фосфатных буферных растворах могут размножаться микроорганизмы, поэтому их хранят в холодильнике.

Алифатические амины снижают полярность поверхности сорбента, поэтому изменяется и эффективность разделения.

При подготовке подвижной фазы, состоящей из органического растворителя и буферного раствора, необходимо учитывать, что в результате смешивания на 1–2 единицы может увеличиться рН и элюент станет агрессивным к сорбенту. Поэтому необходимо указывать рН водной части, а не элюента.

В жидкостной хроматографии применяют два типа элюирования: изократическое и градиентное.

В *изократическом элюировании* применяют один растворитель постоянного состава. При *градиентном элюировании* состав подвижной фазы непрерывно изменяется, например, доля метанола в смеси с водой увеличивается от 30 до 70 об. %. В этом случае достигается эффект, аналогичный программированию температуры в газовой хроматографии: сокращается время анализа.

### 3.2.6. Детекторы

В жидкостной хроматографии применяют детекторы, позволяющие непрерывно фиксировать концентрацию определяемого вещества в подвижной фазе. Известно три типа детекторов:

- реагируют на определенное свойство растворителя (рефрактометрические, детекторы по электропроводности и диэлектрической проницаемости);
- реагируют на свойства определяемых веществ (спектрофотометрические, полярографические, детекторы по радиоактивности);
- работают после удаления растворителя (пламенно-ионизационный детектор).

Наиболее часто применяются оптические и электрохимические детекторы.

В каждом конкретном случае подбирают подходящий детектор, так как универсального детектора для жидкостной хроматографии нет.

**Оптические детекторы.** Среди оптических детекторов различают: спектрофотометрические — УФ-детекторы ( $\lambda = 190\text{--}380$  нм), детекторы для видимой области ( $\lambda = 380\text{--}800$  нм) и ИК-детекторы; рефрактометрические; флуориметрические.

Работа **спектрофотометрических детекторов** основана на измерении поглощения света в видимой УФ- и ИК-областях. Они являются неdestructивными, имеют достаточную чувствительность, высокий линейный динамический диапазон, малочувствительны к изменениям температуры и колебаниям потока подвижной фазы.

В качестве источников излучения применяют ртутные лампы низкого давления (254 нм), среднего давления (280 нм) или светополоты.

Наиболее простым и доступным является **УФ-спектрофотометрический детектор**. Детектирование им обычно проводят

при длине волны 254 нм. В этой области спектра имеют высокое поглощение многие органические вещества (см. приложение 4).

Для получения веществ, сильнопоглощающих в УФ-области спектра, проводят дериватизацию с применением N-сукцинимидил-*n*-нитрофенилацетата, фенилгидразина, 3,5-динитробензоилхлорида и др. Дериватизация проводится как до, так и после разделения (перед поступлением в детектор).

Применение *диодной матрицы* позволяет с большой скоростью без остановки потока подвижной фазы измерять поглощение света в широком диапазоне длин волн. Пучок света после прохождения через исследуемый раствор разделяется на дифракционной решетке. Измерение интенсивности светового потока производится с помощью единичных умножителей, собранных в решетку. Современные хроматографы оснащены матрицами, содержащими до 500 диодов, позволяющих измерять оптическую плотность в области длин волн от 180 до 800 нм.

Работа *инфракрасного детектора* (ИКД) основана на поглощении света в ИК-области спектра. ИКД применяется для идентификации органических веществ. В качестве растворителей используют тетрахлорид углерода, хлороформ и сероуглерод.

**Рефрактометрический детектор** (РМД) позволяет непрерывно измерять разность показателей преломления сравнительной подвижной фазы и ПФ с анализируемым компонентом. Основными недостатками этого детектора являются высокая чувствительность к изменению температуры и скорости потока подвижной фазы, а также нечувствительность к веществам, имеющим одинаковый с растворителем показатель преломления. РМД удобен в работе, не вызывает деструкцию анализируемых веществ и имеет хорошую воспроизводимость результатов.

Вклад растворенного вещества в изменение показателя преломления растворителя пропорционален концентрации этого вещества.

Основное преимущество **флуориметрического детектора** (ФМД) — более высокая чувствительность по сравнению с детекторами поглощения. Чувствительность ФМД в 100 раз выше, чем у УФ-спектрофотометрического. Применение монохроматического лазера и гибких оптических световодов вместо ртутной лампы повышает чувствительность ФМД. Принцип действия основан на измерении флуоресцентного излучения.

Применяют ФМД для количественного определения аминокислот, витаминов, стероидов и других флуоресцирующих соединений (см. приложение 5).

Получение флуоресцирующих производных с помощью химических реакций позволяет значительно повысить селективность определения органических соединений. Для получения флуоресцирующих соединений применяют дансилхлорид, 4-бром-метил-7-метоксикумарин и флуорескамин (см. приложение 6). Предел детектирования для сильнофлуоресцирующих веществ —  $10^{-9}$  г/мл. Широкие возможности появляются у лазериндуцируемого флуоресцентного детектора.

**Электрохимические детекторы.** Высокая чувствительность и селективность электрохимических детекторов (ЭХД) позволяет применять их при анализе биологически активных соединений, а также при исследовании загрязнений окружающей среды. Электрохимический способ детектирования основан на электрохимических свойствах соединений подвижной фазы. Применение ЭХД позволяет регулировать селективность при смене режимов работы детекторов, замене или модифицировании детекторов. Влияние температуры на работу ЭХД незначительно.

В электрохимических детекторах (вольтамперометрический, полярографический и некоторые типы кулонометрических) измеряется ток как функция времени при постоянном напряжении на электродах.

**Вольтамперометрический детектор** (ВАД) применяется при анализе как неорганических, так и органических веществ. Селективность детектора определяется значением потенциала окисления или восстановления. Электроактивными являются ароматические соединения, а также соединения с кратными связями.

В детекторе два электрода — рабочий и сравнительный. Потенциал рабочего электрода устанавливается по отношению к потенциалу сравнительного электрода (каломельный, хлорсеребряный).

Работа **полярографического детектора** (ПГД) основана на измерении силы электрического тока между поляризуемым и неполяризуемым электродами. Разработаны методики определения стероидов, нитроанилинов, нитрофенолов, нитроалканов с применением ПГД.

В *кулонометрических детекторах* анализируемые вещества электризуются полностью, рабочие электроды имеют большую поверхность.

Детектирование соединений, имеющих высокий окислительно-восстановительный потенциал, проводится на двух электродах, расположенных последовательно.

Недостатками ЭХД являются работа со ртутью и уменьшение чувствительности в связи с изменением характеристик электродов с течением времени.

### 3.3. Распределительная жидкостная хроматография

Распределительная жидкостная, или жидко-жидкостная, хроматография применяется более широко по сравнению с методами, основанными на адсорбции, ионном обмене и эксклюзии. Этим методом обычно определяют полярные соединения (фармацевтический, биохимический, клинический, промышленный анализы). Распределительная жидкостная хроматография (РЖХ) осуществляется в трех вариантах: колоночном, на бумаге и в тонком слое сорбента.

Разделение веществ в РЖХ основано на различии коэффициентов распределения вещества между двумя несмешивающимися жидкостями: одна из них является подвижной фазой, другая — неподвижная фаза — находится на твердом носителе.

Эффективность разделения смеси веществ зависит как от селективности применяемых фаз, так и от эффективности колонки, которая определяется вязкостью и коэффициентом диффузии применяемых жидкостей. В качестве подвижных фаз применяют маловязкие растворители, что несколько сокращает продолжительность анализа.

В РЖХ используются различные системы. Если подвижной фазой служат неполярные растворители (изооктан, бензол и др.), а полярный растворитель (вода, этанол) зафиксирован на твердом носителе (силикагель, оксид алюминия, диатомит), то это нормально-фазовая распределительная жидкостная хроматография. В обращенно-фазовой хроматографии на носителе находится



неполярный растворитель, а в качестве подвижной фазы используют полярные растворители (этанол, вода, буферные растворы и др).

### 3.3.1. Неподвижные фазы и носители

В качестве **неподвижных фаз** в РЖХ применяют жидкости, иммобилизованные на носителе или химически закрепленные фазы. Жидкие фазы, нанесенные на твердый носитель, быстро смываются подвижной жидкой фазой, особенно в ВЭЖХ, поэтому их химически прививают к носителю.

Постоянство состава фаз достигается двумя способами:

- подвижную фазу насыщают неподвижной, например, встряхивают в течение 24 ч подвижную фазу с избытком неподвижной при температуре работы хроматографической колонки;
- проводят химическое закрепление неподвижной фазы на твердом носителе.

Современная промышленность выпускает силанизированные носители с закрепленной на их поверхности жидкой фазой.

Связь иммобилизированной жидкости с носителем непрочная, поскольку осуществляется она за счет физической адсорбции. Поэтому носитель предварительно насыщают жидкостью из подвижной фазы. Химически закрепленные фазы практически более важны. Они применяются как в нормально-фазовой, так и в обращенно-фазовой хроматографии.

К **носителям неподвижной фазы** предъявляются определенные требования: они должны иметь достаточно развитую поверхность, быть химически инертными, не адсорбировать анализируемые вещества, прочно удерживать неподвижную жидкую фазу, не растворяться в применяемых растворителях.

В качестве носителей применяются силикагель, оксид алюминия или полимерные сорбенты. Поверхность силикагеля состоит из силанольных (гидроксильных) групп. Для гидрофобизации поверхности силикагеля проводят обработку алкилхлоросиланами. Длинные алкильные группы ( $C_8$ — $n$ -октил,  $C_{18}$ — $n$ -октадецил) располагаются параллельно друг другу и перпендикулярно поверхности частиц. Силикагели с привитыми алкилсилильными группами (от  $C_2$  до  $C_{22}$ ) используются в обращенно-фазовой хроматографии.

Силанизирование является оптимальным, если поверхность носителя покрыта силанольными группами не более чем на 50 %. Силанольные фазы устойчивы в определенных условиях (рН 2–8; полярные подвижные фазы, содержащие воду, метанол, ацетонитрил). При  $\text{pH} > 8$  силанольные фазы разрушаются в результате гидролиза.

Химически привитые фазы используются также и в нормально-фазовой хроматографии. В качестве функциональных групп выступают диол-, циано-, amino-, диметиламино- и диамино-группы.

К *гидрофильным носителям*, которые прочно удерживают воду, служащую неподвижной жидкой фазой, относятся силикагель и целлюлоза. Основной недостаток гидрофильных носителей связан с тем, что процесс распределения вещества зависит от состава и кислотности водной фазы.

В качестве *гидрофобных носителей* применяют различные полимеры (фторопласты, ацетилцеллюлоза и др.), нерастворимые в воде и ненабухающие в органических растворителях. Как и в газовой хроматографии, в распределительной жидкостной хроматографии широко применяются поверхностно-пористые носители.

### 3.3.2. Подвижные фазы

Выбор подвижной фазы зависит от полярности неподвижной фазы и разделяемых компонентов. Неподвижная фаза, как правило, должна иметь полярность, близкую к полярности разделяемых компонентов. При близких полярностях подвижной и неподвижной фаз наблюдаются малые времена удерживания. Сильное различие полярности подвижной и неподвижной фаз приводит к слишком большим временам удерживания. Значения коэффициента емкости должны быть от 2 до 5. В ОФХ оптимальными являются смеси метанола, ацетонитрила и тетрагидрофурана.

Другие спирты, кроме метанола, используют значительно реже, потому что высокая вязкость водно-спиртовых элюентов приводит к высокому рабочему давлению и ухудшению эффективности разделения в связи с затрудненной диффузией в подвижной фазе.

Основной недостаток тетрагидрофурана — нестабильность при хранении (в результате окисления образуются гидропероксиды,

уменьшающие диапазон пропускания УФ-света и вступающие в реакции окисления привитой фазы и сорбата).

Ацетонитрил имеет определенные преимущества перед метанолом, так как лучше растворяет органические пробы, водно-ацетонитрильные смеси менее вязкие, чем водно-метанольные. К тому же ацетонитрил не относится к группе особо опасных ядов, подобных метанолу.

В ОФХ полярные соединения элюируются первыми; чем более полярная подвижная фаза, тем сильнее удерживаются неполярные соединения.

В НФХ используют смеси диэтилового эфира, дихлорметана и хлороформа. Полярные соединения элюируются последними, так как полярность неподвижной фазы больше полярности подвижной фазы.

Полярность смеси растворителей рассчитывается с использованием индексов полярности индивидуальных растворителей (см. приложение 2), например, полярность водно-метанольной смеси (70/30):

$$P'_{\text{см/вода}} = 0,3P'_{\text{мет}} + 0,7P'_{\text{вода}} = 0,3 \cdot 5,1 + 0,7 \cdot 10,2.$$

Общая формула для расчета полярности смеси растворителей

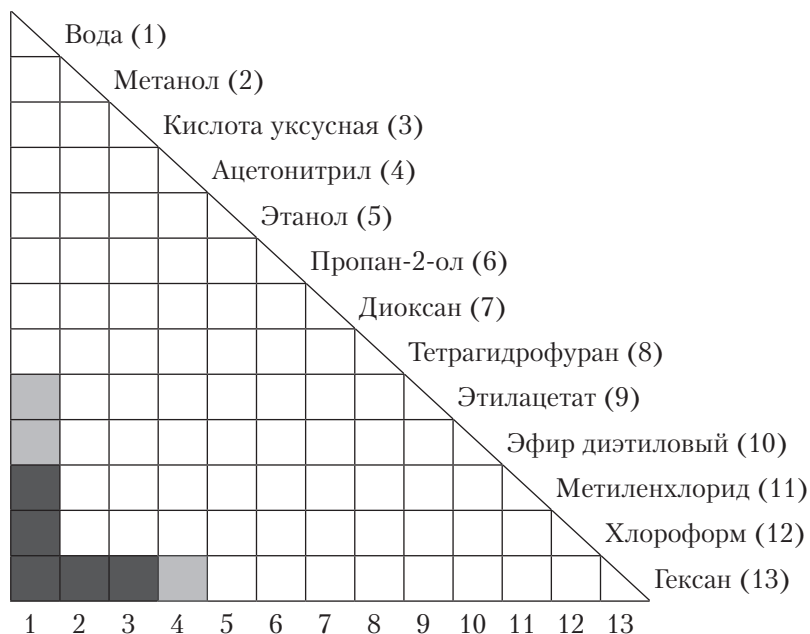
$$P'_{\text{см}} = \sum P_i \Phi_i, \quad (3.9)$$

где  $\Phi_i$  — объемная доля растворителя.

При работе со смешанными подвижными фазами, состоящими из нескольких растворителей, необходимо иметь данные об их взаимной растворимости (рис. 3.3).

Растворимость и смешиваемость — это разные понятия. Смешивающимися называют компоненты, которые могут быть смешаны друг с другом в любой пропорции и при этом не формируются две отдельные фазы. Если при смешивании компонентов образуется межфазная граница, то это несмешивающиеся компоненты.

Растворимость компонента *A* — это способность образовывать до определенной концентрации истинные растворы в растворителе *B*. Насыщенные растворы могут быть и разбавленными (например,  $\text{AgCl}$  в воде), так как растворимость различных веществ изменяется в широких пределах.

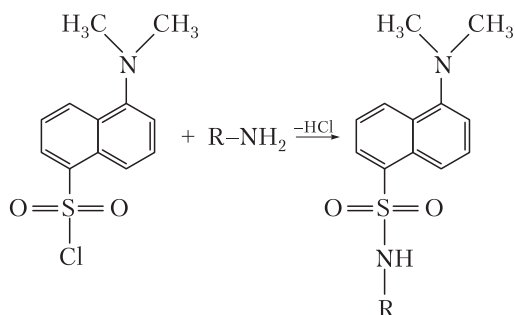


**Рис. 3.3.** Взаимная растворимость некоторых органических растворителей:

□ — полная; □ — ограниченная; ■ — отсутствует

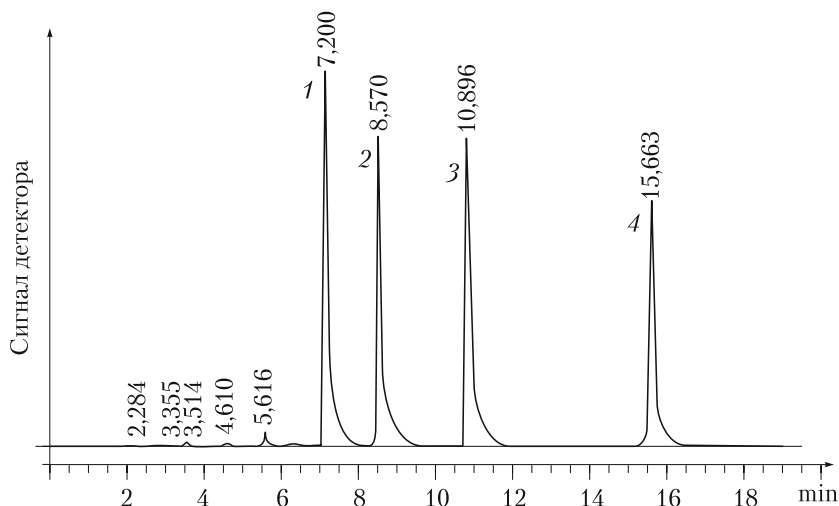
Взаимная растворимость двух веществ определяется взаимодействием между молекулами растворенного вещества и растворителя. Вещество *A* будет растворяться в растворителе *B* только в том случае, если силы взаимодействия между молекулами *A* и *B* превосходят силы межмолекулярного притяжения *A...A* и *B...B* (см. приложение 7).

Одним из способов изменения свойств определяемых соединений является их дериватизация. При этом может быть изменена полярность, повышены чувствительность детектирования и селективность определения. При дериватизации, например, аминокислоты или пептидного остатка ( $R-NH_2$ ) с использованием дансилхлорида (1-диметиламинонафталин-5-сульфонилхлорид) получается флуоресцирующее соединение:



Распределительная жидкостная хроматография успешно применяется в тех случаях, когда разделяемые компоненты смеси претерпевают каталитические изменения на активных сорбентах. Жидкая подвижная фаза подавляет активность сорбента. Чаще РЖХ применяется при разделении средне- и сильнополярных соединений.

Хроматограмма смеси, содержащей производные ксантина, представлена на рис. 3.4. Очевидно, что хроматографический метод позволяет проводить как обнаружение, так и количественное определение близких по химической природе веществ.



**Рис. 3.4.** Хроматограмма смеси производных ксантина:  
1 — теобромин; 2 — теофиллин; 3 — кофеин; 4 — внутренний стандарт — пентоксифиллин; ПФ — вода — ацетонитрил, 5–30 % (градиентный режим); НФ — Zorbax Eclipse SB-C 18

### 3.4. Ионообменная хроматография

В основе ионообменной хроматографии лежит обратимый стехиометрический обмен ионов, содержащихся в жидкой подвижной фазе, на ионы неподвижной фазы. Неподвижной фазой могут быть твердые (иониты) или жидкие вещества. **Ионитами** или **ионообменниками** называют вещества, способные к обмену подвижными ионами. Основным процессом, протекающим на ионитах, является ионный обмен, хотя имеет место и физическая адсорбция.

Первые синтетические иониты были разработаны в 30-х гг. XX в. Впервые разделение смеси ионов методом ионообменной хроматографии осуществлено в 1947 г. Т.Б. Гапоном, Е.Н. Гапоном и Ф.М. Шемякиным.

В зависимости от знака заряда обменивающихся ионов различают **катиониты** (катионообменники) и **аниониты** (анионообменники). **Амфотерные иониты** называют амфолитами, они содержат и кислотные, и основные группы. Монофункциональный ионообменник содержит только однотипные (кислотные или основные) группы, полифункциональный — разнотипные кислотные (например,  $-\text{SO}_3\text{H}$  и  $-\text{OH}$ ) или основные группы.

#### 3.4.1. Иониты

Ионит в целом нейтрален, так как положительный или отрицательный заряд матрицы компенсируется зарядом противоионов. От наличия фиксированных ионов кислотных или основных остатков молекул зависит заряд матрицы.

Подвижность противоионов обуславливает их ионообменную способность. Ионный обмен, основанный на статическом распределении между ионитом и раствором, можно представить уравнениями:

катионный обмен



анионный обмен



где R — матрица ионита;  $\text{An}^-$ ,  $\text{Kt}^+$  — фиксированные ионы матрицы.

Распределение ионов между раствором и ионитом характеризуется коэффициентом распределения  $D$ :

$$\begin{aligned} D^{\text{Na}^+} &= [\text{RAn}^-\text{Na}^+] / [\text{Na}^+]; \\ D^{\text{Cl}^-} &= [\text{RKt}^+\text{Cl}^-] / [\text{Cl}^-]. \end{aligned} \quad (3.12)$$

Коэффициенты распределения определяют в статических или динамических условиях, их используют для расчета удерживаемых объемов разделяемых ионов:

$$V_R = V_m + DV_s. \quad (3.13)$$

Константа равновесия, например, для приведенного выше катионного равновесия (3.10) имеет вид:

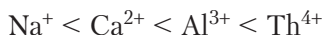
$$K^\circ = [a_{\text{H}^+} a_{\text{RAn}^-} a_{\text{Na}^+}] / [a_{\text{Na}^+} a_{\text{RAn}^-} \text{H}^+], \quad (3.14)$$

где  $a$  — активность частиц.

Обычно пользуются концентрационными константами равновесия:

$$K_{\text{H}^+/\text{Na}^+} = \frac{[\text{H}^+][\text{RAn}^-\text{Na}^+]}{[\text{Na}^+][\text{RAn}^-\text{H}^+]}. \quad (3.15)$$

На основании концентрационных констант ионного обмена построены ряды сродства катионов к данному иониту, что позволяет прогнозировать возможность разделения ионов. Установлено, что с ростом заряда увеличивается сродство ионов к иониту, т.е. сорбируемость, например, в ряду



увеличивается.

В ряду гидратированных ионов одинакового заряда:



сродство к катионообменнику уменьшается.

Для анионообменников также установлены ряды сродства:



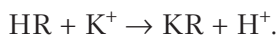
Селективность ионита зависит как от природы ионита, структуры его матрицы, так и от условий эксперимента (pH среды, тем-

пература и др.). При обмене разнозарядных ионов из разбавленных растворов преимущественно поглощается ион с большим зарядом, из концентрированных — с меньшим зарядом. С повышением температуры селективность, как правило, уменьшается.

Селективность разделения можно изменить подбором подвижной фазы (состав, pH, ионная сила, содержание органического растворителя) либо изменением пористости сорбента (получение ионитовых сит) и природы и расположения ионогенных групп. Введение в структуру сорбента органических реагентов (дитизон, диметилглиоксим, 8-оксихинолин, краун-эфиры и др.) позволяет достичь высокой селективности.

Ионообменная хроматография применяется в основном для разделения ионов. Количественное определение разделенных компонентов проводится химическим или инструментальным методом. С помощью ионообменной хроматографии можно разделить близкие по свойствам ионы: натрия и калия, циркония и гафния, лантаноиды.

На ионном обмене основан метод определения суммарного содержания катионов или анионов в растворе. Если анализируемый раствор, например раствор KCl, пропустить через катионит в H-форме, то в растворе появляется эквивалентное количество H<sup>+</sup>-ионов:



Титриметрическим методом определяют концентрацию ионов водорода, а затем рассчитывают концентрацию ионов калия в растворе.

На ионном обмене основан процесс получения деминерализованной воды. Вода, предназначенная для очистки, обрабатывается катионитом в H-форме и анионитом в OH-форме. В результате обмена на катионите и анионите в растворе появляются ионы H<sup>+</sup> и OH<sup>-</sup>, которые, взаимодействуя, образуют воду.

С помощью ионообменных мембран возможно получение чистых кислот и щелочей. Ионная проницаемость ионообменных мембран отличается высокой селективностью: через мембраны из анионита проходят только анионы, а через мембраны из катионита — только катионы. Например, при электролизе Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> получают чистые NaOH и H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

В качестве ионитов используют как природные, так и синтетические соединения.



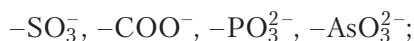
**Цеолиты** — минеральные иониты, способные обмениваться катионами. Противоионами в таких ионитах являются ионы щелочных и щелочноземельных металлов. Цеолиты обладают ситовым эффектом, в их решетку не могут проникать молекулы или катионы больших размеров, поэтому цеолиты применяют в качестве ионных или молекулярных сит.

При сульфировании каменных углей серной кислотой и при их окислении в угли вводятся подвижные сульфо- и карбоксильные группы. Такие угли используют в качестве ионообменников. Высокая селективность окисленных углей позволяет разделять катионы с одинаковыми по величине зарядами (например, ионы кальция и магния).

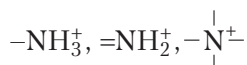
Из синтетических полимерных веществ наибольшее применение находят **синтетические ионообменные смолы**, которые отличаются механической прочностью и химической стойкостью, высокой обменной емкостью и селективностью.

Твердые ионообменники состоят из макромолекул нитевидного или каркасного строения, содержащих ионообменные группы.

В гидрофобной матрице синтетических ионообменных смол закреплены группы, несущие заряд (фиксированные ионы). Такими группами для катионов являются:



для анионов



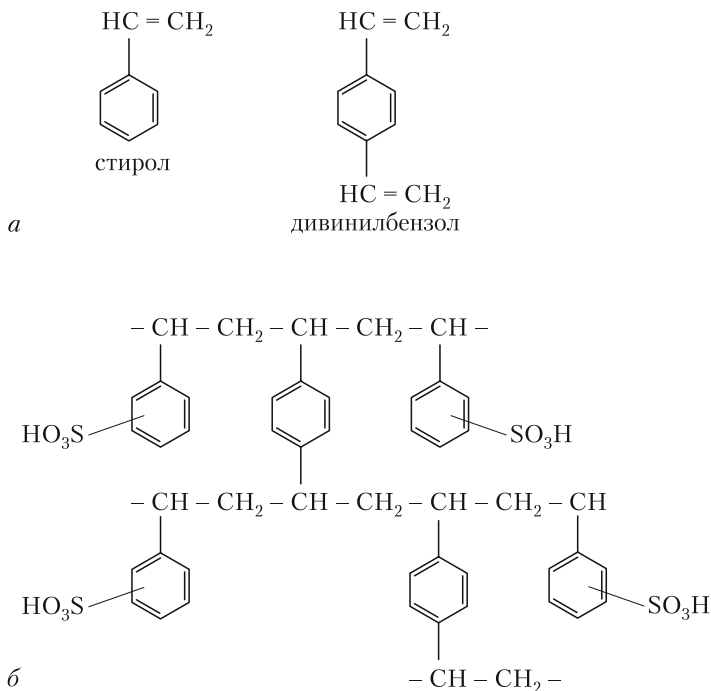
Иониты не растворяются в воде и других растворителях, не способных разрушить прочные С—С-связи. Ионообменник способен к набуханию, так как это полиэлектролит с каналами и порами.

Основные методы синтеза ионообменных смол — поликонденсация и полимеризация. Исходными мономерами служат формальдегид и паразамещенные фенолы, стирол и дивинилбензол, этилендиамин, эфир этиленгликоля и стирола и др.

Методом полимеризации получают монофункциональные ионообменники, методом поликонденсации — полифункциональные. В качестве сшивающего агента при получении катионообменников чаще на основе стирола применяется дивинилбензол (рис. 3.5).

Ионообменная емкость таких сорбентов в 5–10 раз больше, чем у сорбентов на основе силикагеля (табл. 3.6). Они могут работать при более высоких значениях pH и имеют большой срок годности.

Свойства синтетических органических ионитов определяются строением матрицы, типом подвижных ионов и противоионов, числом и типом фиксированных ионов.



**Рис. 3.5.** Структура стирола и дивинилбензола (*a*) и кислотного катионообменника на их основе (*б*)

Подвижность противоионов зависит от числа гидрофильных групп и количества поперечных связей в матрице.

В ионообменной хроматографии органических соединений (биохимические смеси) используют **модифицированные целлюлозы** — карбоксиметилцеллюлоза (слабокислотные свойства), диэтиламиноэтилцеллюлоза (среднеосновные), а также гидрофильные гели декстрана (сефадексы).

Таблица 3.6

**Структурные формулы некоторых модифицированных силикагелей**

Структурная формула	Название
$\text{SiO}_2 \text{---} \text{O---Si} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{CH}_3 \end{matrix}$	Диасорб-130-ДЕАЕ
$\text{SiO}_2 \text{---} \text{O---Si} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{N}^+ \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$	Диасорб-130-ТА
$\text{SiO}_2 \text{---} \text{O---Si} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{---CH}_2\text{COOH}$	Диасорб-130-Карбокси
$\text{SiO}_2 \text{---} \text{O---Si} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{SO}_3\text{H}$	Диасорб-130-Сульфо
$\text{SiO}_2 \text{---} \text{O---Si} \begin{matrix} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{matrix} \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH(OH)CH}_2\text{N} \begin{matrix} \text{CH}_2\text{COOH} \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{matrix}$	Диасорб-130-ИДК

Декстрановые гели подобны макропористым ионообменным смолам. Для них, как и для целлюлозных ионитов, характерна высокая гидрофильность. Декстрановые гели изготавливаются в форме шариков. Диаметр пор в декстрановых гелях больше, чем в ионообменных смолах. Такие иониты применяются главным образом в гель-хроматографии, так как в них могут проникать макромолекулы.

### 3.4.2. Классификация ионообменных смол

Классификация ионообменных смол (ионитов) основана на их кислотно-основных свойствах. Различают четыре типа ионитов.

К *первому типу* относят иониты, проявляющие свойства сильных кислот и сильных оснований. В катионитах этого типа (КУ-2, сульфогель, амберлит ИР-120, дауэкс-50 и др.) ионогенными являются сульфогруппы  $\text{---SO}_3\text{H}$ , содержащие противоион (ион водорода).

Обменная емкость анионитов первого типа, так же как и катионитов, не зависит от pH раствора. В матрице анионитов этого типа содержатся группы  $-\overset{|}{\underset{|}{\text{N}}}^+$ , которые легко обменивают гид-

роксильные ионы на анионы из раствора. Аниониты первого типа: АВ-17, амберлит ИРА-400, дауэкс-1 и др.

Иониты *второго типа* проявляют свойства слабых кислот и слабых оснований.

В кислых растворах обменная емкость катионитов второго типа близка к нулю. Возрастание обменной емкости наблюдается при повышении pH и зависит от природы катионита и концентрации катионов в растворе. Фиксированными ионами катионитов второго типа являются остатки слабых кислот, например  $-\text{COOH}$ , не диссоциирующие в сильноокислой среде. Такие группы содержат катиониты КБ-2, КБ-4, СТ-1, амберлит ИРЦ-50, вофатит М и др.

В слабоосновных анионитах в качестве фиксированных ионов выступают группы:  $-\text{NH}_3\text{OH}$ ,  $=\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $\equiv\text{NHOH}$ . Обменная емкость таких анионитов зависит от pH. Аниониты второго типа — ЭДЭ-10П, АН-2Ф, ФН-1, амберлит ИР-4Б и др.

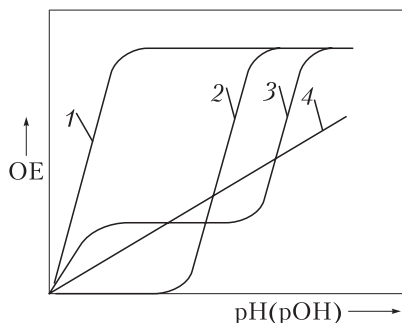
К *третьему типу* относятся иониты, проявляющие свойства смеси сильной и слабой кислот и соответственно оснований. В матрице таких ионитов имеются сильноокислотные и слабоокислотные или сильноосновные и слабоосновные остатки.

Для ионитов *четвертого типа* характерно непрерывное возрастание обменной емкости с повышением pH или pOH раствора (рис. 3.6).

В матрицах ионитов четвертого типа имеются остатки кислот и оснований разной силы. К таким ионитам относят глины, почвы и некоторые минералы.

Тип ионита определяется по графику зависимости обменной емкости от pH (для катионитов) или pOH (для анионитов). Пользуясь методом титрования, строят кривые титрования какого-либо электролита в присутствии или в отсутствии испытуемого ионита. Обменную емкость принято выражать количеством миллимолей обменивающегося противоиона на 1 г отмытого от сорбированных веществ сухого ионита, находящегося для катионитов в водород-

ной форме, а для анионитов в хлоридной или  $\text{OH}^-$ -форме. В технической литературе обменную емкость выражают в килограммах  $\text{CaO}$  на  $1 \text{ м}^3$  отмытого ионита.



**Рис. 3.6.** Зависимость обменной емкости (ОЕ) ионитов от pH (pOH) растворов:

1 — иониты первого типа; 2 — второго типа; 3 — третьего типа;  
4 — четвертого типа

Если обменную емкость рассчитывают в статических условиях (навеску ионита встряхивают с насыщающим раствором), то полученное значение емкости называют *статической обменной емкостью* (СОЕ). Емкость, полученная в динамических условиях (насыщающий раствор пропускают через колонку с ионитом), соответствует *динамической обменной емкости* (ДОЕ). Динамическая обменная емкость определяется по первому появлению насыщающего иона в вытекающем растворе.

Высокая специфичность ионообменных смол достигается при варьировании типа и числа фиксированных ионов, а также при изменении строения матрицы (табл. 3.7).

В названиях ионитов часто встречаются общепринятые обозначения: К — катионит, А — анионит, КФ — катионит фосфорнокислый, АВ — анионит высокоосновный, АН — анионит низкоосновный и т.д.

Названия некоторых ионитов начинаются с начальных букв соединений, из которых они получены: СДВ (Ст-ДВБ) — стирол и дивинилбензол, ЭДЭ — этилендиамин и эпихлоргидрин. В названиях ионитов иностранных фирм обычно указывается название фирмы. В табл. 3.7 приведены сведения о некоторых сорбентах, используемых в ионообменной хроматографии.

Таблица 3.7

**Некоторые сорбенты для ионообменной хроматографии**

Сорбент	Основа	Функциональная группа
Адсорбосфер АХ	Сил (силикагель)	Сульфогруппа
Адсорбосфер СХ		Аммониевая группа
Альтекс ОА-100	Ст-ДВБ	Сульфогруппа
Ионопак		
Нуклеосил А	Сил	Аммониевая группа
Нуклеосил В		
Нуклеосил 11		
Синхропак СМ-300		
Сферисорб АХ		
		Диметиламиногруппа
		Карбоксикислота
		Аммониевая группа

**3.4.3. Подвижные фазы**

В ионообменной хроматографии в качестве подвижной фазы в основном применяется вода. В воде ионогенные группы гидратируются и переходят в диссоциированную форму. Элюирующая способность подвижной фазы зависит от рН, ионной силы, природы буферного раствора и содержания органического растворителя.

Добавка в подвижную фазу смешивающихся с водой органических растворителей (метанол, этанол, ацетонитрил, диоксан) действует аналогично добавке этих растворителей в ОФХ: элюирующая сила растет, удерживание образца снижается. Для менее полярных растворителей этот эффект более выражен. При добавлении органических растворителей можно добиться также изменения селективности хроматографической системы.

Работа с сильнокислотными и сильноосновными ионитами проводится при рН 2–12, со слабоосновными – 2–6, со слабокислотными – 5–12. При разделении слабых кислот или слабых оснований оптимальное значение рН подвижной фазы рассчитывают по формулам:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + 1,5 \text{ (слабые кислоты),}$$

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{BH}^+} - 1,5 \text{ (слабые основания).}$$

В качестве подвижной фазы, кроме воды, используют буферные растворы (ацетатный, боратный, гидрокарбонатный, фосфатный), растворы минеральных (азотная, серная, хлороводородная, фосфорная) и органических кислот (винная, лимонная, молочная, щавелевая).

### 3.5. Ионная хроматография

Ионная хроматография – высокоэффективный вариант ионообменной хроматографии. Высокая эффективность достигается применением специально разработанных сорбентов с небольшой емкостью и небольшим размером частиц и высокочувствительных детекторов (рис. 3.8). В качестве детекторов применяются как универсальный (кондуктометрический), так и селективные детекторы: электрохимические (кулонометрический, полярографический и др.) и спектроскопические (спектрофотометрический, люминесцентный). Однако наиболее часто применяется кондуктометрический детектор.

В качестве сорбентов используют стекла или полимерные частицы, покрытые тонким слоем пористого ионообменника, в качестве неподвижной фазы — пористый силикагель, покрытый жидкими ионообменниками.

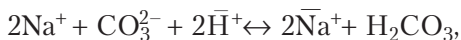
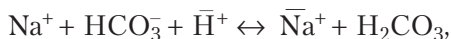
В ионной хроматографии применяются два основных метода: двух- и одноколоночный.

Применение прямого кондуктометрического детектирования в ионной хроматографии затруднено, так как элюент содержит электролиты в высокой концентрации и обладает собственной электропроводностью. Поэтому в *двухколоночном методе* используются две колонки: разделительная и компенсационная (подавляющая).

При определении анионов подавляющая колонка находится за разделительной и заполняется катионообменником в  $H^+$ -форме.

В качестве подвижной фазы используются соли слабых кислот, например  $NaHCO_3$ ,  $Na_2CO_3$ .

С катионообменником подвижной фазы реагируют ионы подвижной фазы, выходящие из разделяющей колонки:

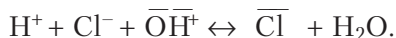


черта указывает, что ион находится в фазе ионообменника.

Ионы подвижной фазы в результате ионного обмена превращаются в угольную кислоту, которая имеет очень малую электропроводность. На определяемые ионы (хлориды, нитраты и др.) пода-

вляющая колонка не оказывает никакого влияния, и они сохраняют электропроводность.

При определении катионов подавляющую колонку заполняют анионообменником в  $\text{OH}^-$ -форме, а разделяющую — катионообменником. Подвижной фазой обычно служит раствор хлороводородной кислоты. В подавляющей колонке происходит реакция:



В этом случае электропроводность также определяется ионами анализируемого образца, потому что ионы подвижной фазы превращаются в молекулы малодиссоциированной воды.

Пределы обнаружения в *одноколоночном варианте* ионной хроматографии обычно выше, чем в двухколоночном, а линейность градуировочного графика наблюдается в более узком диапазоне концентраций определяемого вещества.

В связи с непродолжительным сроком службы подавляющих колонок предложены мембранные подавители, которые регенерируются в процессе работы. В качестве подавителя электропроводности элюента применяют и полые волокна из ионообменного материала, в которых происходит кольцеобразное движение потока, а не послойное, как в подавителе электропроводности на основе микромембран.

При низкой электропроводности элюента можно работать с одной разделяющей колонкой с ионообменником малой емкости. В качестве элюентов в одноколоночной анионной хроматографии применяют растворы слабых органических кислот (бензойной, фталевой, салициловой) с низкой электропроводностью. Электропроводность разделяемых анионов (хлоридов, нитратов и др.) значительно превышает электропроводность слабых органических кислот, и при элюировании на хроматограмме регистрируются соответствующие пики. Если в качестве элюентов используют разбавленные растворы солей щелочных металлов, то регистрируются отрицательные пики, так как при замене гидроксид-иона на другой анион электропроводность уменьшится.

В катионной одноколоночной хроматографии в качестве элюента используют хлороводородную или азотную кислоту. В результате замены высокоподвижных ионов водорода на другие катионы также появляются отрицательные пики.



В ионной хроматографии большинство сорбентов в качестве основы содержат силикагель или матрицу, покрытую полимером на основе стирола или дивинилбензола (табл. 3.8).

Таблица 3.8

**Некоторые сорбенты, применяемые в ионной хроматографии**

Сорбент	Основа	Разделяемые ионы
Альтекс IC-1000	АСт	Анионы
Альтекс IC-5000	ПСт	Катионы
Вескан А	Силикагель	Неорганические и органические анионы
Вескан ВМ	Ст-ДВБ	Неорганические и органические катионы
Видак 300 IC	Силикагель	Анионы
Видак 400 IC	Силикагель	Катионы
Хамильтон	Ст-ДВБ	Анионы
ХИКС-1	Сепарон	Катионы

*Примечание.* АСт — акрилостирол, ПСт — полистирол.

Преимущества метода ионной хроматографии – возможность разделения и количественного определения легкоионизируемых органических соединений (кислот, аминов и др.), которые легко растворяются в воде и которые трудно определить другими хроматографическими методами.

### 3.6. Ион-парная хроматография

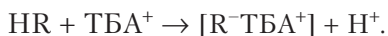
В методе ион-парной хроматографии применяют сорбенты на основе силикагеля с привитыми алкильными группами  $C_8$ – $C_{18}$ . Ионизированные вещества хорошо растворяются в полярной подвижной фазе и разделяются на такой неподвижной фазе, так как они слабо удерживаются на неполярной поверхности модифицированного силикагеля.

Для модификации неполярной неподвижной фазы в подвижную фазу вводят ион-парный реагент (алкиламины, алкилсульфонаты, алкилсульфаты и другие ионогенные поверхностно-активные вещества). Ион-парный реагент имеет большую органическую

часть и хорошо адсорбируется на неполярной неподвижной фазе (алкилированный силикагель). После такой модификации поверхность сорбента приобретает свойства ионообменника.

В зависимости от природы ион-парного реагента модифицированный сорбент может быть как катионо-, так и анионообменником. Например, сорбент, подвижность которого модифицирована перхлорат-ионами, алкилсульфатом ( $\text{RSO}_4^-$ ) или алкилсульфонатом ( $\text{RSO}_3^-$ ), является катионообменником. Введение в подвижную фазу гидросульфата тетрабутиламмония превращает неподвижную фазу в анионообменник, на котором можно разделить ионы серебра, меди, никеля, кобальта, золота в виде анионных цианидных комплексов.

Известны и другие механизмы удерживания и разделения ионных соединений. Если разделяемые компоненты способны образовывать ионные ассоциаты с ион-парным реагентом, то разделение ионных пар будет проходить в соответствии с их свойствами удерживаться на поверхности силикагеля. На таком механизме разделения основан анализ ароматических кислот, которые с ионами тетрабутиламмония (ТБА) в подвижной фазе образуют ионные пары:



### 3.7. Лигандообменная хроматография

В 1961 г. Ф. Гельферих предложил метод лигандообменной хроматографии для выделения диамина. Через колонку, заполненную ионообменником и насыщенным раствором аммиака меди, пропускали исследуемый раствор диамина; каждая молекула диамина вытесняет две молекулы аммиака. Затем при пропускании через колонку концентрированного раствора аммиака диамин выделяли из колонки.

В лигандообменной хроматографии подвижная и неподвижная фазы могут содержать комплексообразующие ионы металла. Подбирают такой ионообменник, который прочно удерживает ион металла. В этом случае необходимыми условиями для разделения смеси веществ являются различие между константами комплексообразования веществ и разница в значениях коэффициентов рас-

пределения комплексов между подвижной и неподвижной фазами. Лигандом может быть нейтральная молекула или анион, связанные с ионом комплексообразователя координационной связью. Один лиганд может замещать другой в комплексе при условии, что связь металл — лиганд лабильна.

В качестве разделяющего агента чаще используются комплексы меди (II), цинка и никеля с L-пролином, L-гидроксипролином или L-фенилаланином, а также лиганды с кадмием, ртутью (II) и серебром (I).

Лигандообменная хроматография наиболее эффективна при разделении рацемических смесей аминокислот. При этом возможны ионообменный, ион-парный и обращенно-фазовый варианты. В лигандообменной хроматографии используют органические и неорганические сорбенты, а также комбинации органических и неорганических структур (силикагель с привитыми функциональными группами). В качестве подвижных фаз применяют смеси аммиака или пиридина с ацетонитрилом. Иногда в подвижную фазу добавляют соли соответствующего металла-комплексообразователя. Например, при разделении аминокислот на сульфированной полистирольной основе в качестве ПФ используют ацетатные буферные растворы (рН 4,1) с добавкой ионов цинка.

Метод лигандообменной хроматографии применяется для разделения аминокислот, пептидов, фенолов, нитрофенолов.

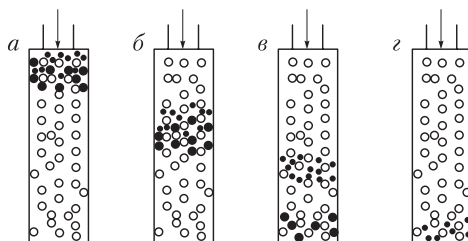
### 3.8. Эксклюзионная хроматография

В научной литературе встречаются различные синонимы термина «эксклюзионная хроматография» (от англ. **size exclusion** — **исключение по размеру**): гель-хроматография, ситовая, гель-проникающая, гель-фильтрационная. Все эти термины обозначают один и тот же процесс, хотя в технике исполнения (гель-фильтрационная и гель-проникающая хроматографии) отличия имеются, поэтому некоторые авторы делят эксклюзионную, или гель-хроматографию, на гель-фильтрационную и гель-проникающую.

Разделение компонентов смеси в гель-хроматографии происходит в результате того, что мелкие молекулы проникают в поры геля и задерживаются, а более крупные не способны проникнуть

в поры и движутся вдоль слоя сорбента быстрее (рис. 3.7). Удержание веществ обусловлено различиями в размерах молекул веществ, их форме и способности проникать в поры неподвижной фазы.

В гель-хроматографии происходит разделение смеси веществ в зависимости от размеров молекул и их массы и не происходит никаких физико-химических взаимодействий разделяемых веществ с неподвижной фазой.



**Рис. 3.7.** Схема разделения двух веществ методом гель-хроматографии: а — ввод пробы; б — разделение по размерам; в — выход крупных молекул; г — выход мелких молекул

После разделения смеси мелкие молекулы задерживаются в порах геля и позже вымываются подвижной фазой.

С пористостью геля связан внутренний объем пор ( $V_{\text{пор}}$ ). Для слабонабухающих гелей

$$V_{\text{пор}} = gS_r/\rho, \quad (3.16)$$

где  $g$  — масса сухого геля;  $S_r$  — емкость геля по растворителю (соответствует количеству растворителя в граммах, поглощенного при набухании 1 г сухого геля);  $\rho$  — плотность растворителя.

Общий объем геля в колонке ( $V_{\text{об}}$ )

$$V_{\text{об}} = V_0 + V_{\text{пор}} + V_{\text{мт}}, \quad (3.17)$$

где  $V_0$  — мертвый объем колонки (объем между зернами);  $V_{\text{мт}}$  — объем матрицы (собственный объем зерен сухого геля).

Удерживаемый объем несорбируемых молекул равен мертвому объему колонки. Для удерживаемых (проникающих в поры геля) молекул удерживаемый объем

$$V_R = V_o + V_{\text{пор}} \quad (3.18)$$

Уравнение (3.18) соответствует основному уравнению колоночной хроматографии, так как в гель-хроматографии коэффициент распределения  $D = 1$ .

Подвижной и неподвижной фазами является один и тот же растворитель. Таким образом, удерживаемый объем молекул с малыми размерами соответствует сумме мертвого (свободного) объема колонки и объема растворителя в порах неподвижной фазы. Большие молекулы элюируются из колонки вместе с подвижной фазой, т.е.  $V_R = V_o$ .

**Неподвижные фазы (гели).** Гели классифицируют на мягкие, полужесткие и жесткие.

К *мягким гелям* относятся высокомолекулярные органические соединения с незначительным числом поперечных связей. Такие соединения поглощают большие количества растворителя, увеличивая при этом собственный объем. Мягкие гели обладают высокой эффективностью и применяются для разделения смесей низкомолекулярных веществ. Фактор емкости (отношение объема растворителя внутри геля к его объему вне геля) равен 3.

К *мягким гелям* относятся сефадексы (декстрановые гели), агарозные и полиакриламидные гели, крахмал и др.

Хроматографирование на мягких гелях называют гелефильтрацией.

*Полужесткие гели* получают полимеризацией. Фактор емкости полужестких гелей находится в пределах 1,2–1,8. При высоких давлениях они не подвергаются деформации.

Гидрофильность полужестких гелей достигается химической или физической обработкой, например, используют гидрофильные полимеры на основе сульфированного дивинилбензола или полиакриламидных смол.

Полужесткими гелями являются продукты сополимеризации стирола и дивинилбензола — стирогели. Изменяя содержание дивинилбензола, можно регулировать размер пор. При сополимеризации винилацетата и бутандиола-1,4-дивинилового эфира получают полужесткий поливинилацетатный гель. Такие полимеры имеют гидрофобный характер и используются в случае, когда подвижная фаза является неполярной.

К *жестким гелям* относят силикагели и часто пористые стекла, хотя они и не являются гелями. Размер пор жестких гелей не изменяется ни при каких условиях, что обеспечивает высокую проницаемость колонок. Жесткие гели имеют небольшой (0,8–1,1) фактор емкости. Они бывают как гидрофильными, так и гидрофобными.

К недостаткам жестких гелей можно отнести их адсорбционные свойства, так как силикаты содержат гидроксильные группы, а также и большее размывание, чем в мягких и полужестких гелях.

Практическое применение находят такие жесткие гели, как порасил (пористый силикагель), пористые стекла с контролируемым размером пор и синтетические макропористые кремнеземы с жесткой пористой структурой (аэросилогели), а также сорбенты на основе пористого стекла с привитыми углеводами, которые имеют гидрофильный характер поверхности и высокую механическую прочность.

**Подвижные фазы.** К растворителям, применяемым в гель-хроматографии, предъявляются следующие требования:

- способность полностью растворять определяемые соединения;
- растворитель должен смачивать поверхность геля и не адсорбироваться на ней;
- вязкость растворителя должна быть низкой для растворов высокомолекулярных соединений;
- растворитель не должен вызывать сжатия или дополнительного набухания геля.

Растворитель подбирают в зависимости от системы детектирования. Например, хлороформ и тетрахлорид углерода применяют при использовании УФ-детектора, но они непригодны при использовании рефрактометрического детектора.

В качестве растворителей применяют N,N'-диметилформамид, хлороформ, тетрахлорид углерода, толуол, трихлорбензол, м-крезол, тетрагидрофуран и др. Выбор растворителя определяет природой неподвижной фазы.

В зависимости от природы неподвижной фазы различают гель-фильтрационную и гель-проникающую хроматографию. Если неподвижной фазой служат гидроксидные гели, а в качестве подвижной фазы используют водные (буферные) растворы, то это

гель-фильтрационная хроматография. Она применяется в анализе водно-растворимых веществ.

Для разделения гидрофобных веществ применяется гель-проникающая хроматография. В этом случае неподвижная фаза является гидрофобной, а подвижная — неполярной (толуол, тетрагидрофуран, метиленхлорид).

**Детекторы.** Регистрация хроматографических пиков в гель-хроматографии производится детекторами, обычно применяемыми в жидкостной хроматографии (спектрофотометрический, рефрактометрический и др.).

При анализе высокомолекулярных соединений применяют специфический детектор — проточный вискозиметр, измеряющий вязкость элюента.

Появление пика на хроматограмме указывает на наличие высокомолекулярного соединения в подвижной фазе.

**Применение гель-хроматографии.** Гель-хроматография применяется для разделения смесей как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных соединений. Для отделения высокомолекулярных веществ от низкомолекулярных (например, белков от аминокислот и низкомолекулярных пептидов) чаще используется гель-фильтрационная хроматография.

Для разделения смесей веществ с большой молекулярной массой требуется колонка с большей разрешающей способностью, чем для разделения низкомолекулярных веществ с близкими молекулярными массами. Такое разделение основано на различиях во взаимодействиях растворенных веществ с гелем. Установлено, что удовлетворительное разделение веществ достигается, если их молекулярные массы различаются не менее чем на 10 %.

Для разделения гомологов и олигомеров гидрофобных органических веществ (например, жирные кислоты) применяется гель-проникающая хроматография.

Гель-хроматография используется для определения молекулярных масс и молекулярно-массового распределения полимеров различного происхождения.

Определение молекулярных масс основано на линейной зависимости логарифма удерживаемого объема от логарифма молекулярной массы в некотором диапазоне изменения молекулярных масс исследуемых соединений. В качестве стандартных гидро-

фильных веществ используют полиэтиленгликоль, декстраны, сульфированные полистиролы и др. Гидрофобными стандартными веществами могут быть полистирол, полиизопрен, политетрагидрофуран.

### 3.9. Аффинная хроматография

В методе аффинной (биоспецифической) хроматографии разделение веществ происходит за счет различия в биоспецифическом взаимодействии белков, пептидов и других биологически активных веществ с комплементарными сорбционными центрами неподвижной фазы. Аффинная хроматография является вариантом лигандообменной хроматографии и дополняет эксклюзионную и ионообменную хроматографии. Например, лигандообменную хроматографию белков называют также металло-хелат-аффинной хроматографией.

В колонке на матрице фиксируется лиганд, с которым связывается, образуя комплекс, целевой компонент разделяемой смеси. В качестве лигандов используют соединения, взаимодействующие с разделяемыми веществами вследствие биологической функции этих веществ. Например, лигандами при разделении ферментов могут быть их субстраты, ингибиторы или коферменты. При этом остальные компоненты смеси проходят через колонку. Затем через колонку пропускают, например буферный раствор, который способствует разрушению комплекса, и определяемое вещество вместе с буферным раствором вымывается из колонки. Необходимым условием разделения является обратимость взаимодействия определяемого вещества и лиганда.

В качестве матрицы используют различные гели с высокой набухаемостью на основе агарозы и полиакриламида (сефадекс 6В, СМ-сефадекс С 50, трисакрил GF 200 и другие аффи-гели), а также слабосшитые ионообменники, в качестве подвижной фазы — буферные растворы (ацетатный или фосфатный в зависимости от требуемого интервала значений рН).

Десорбция и элюирование связанного белка осуществляется различными способами: понижение рН подвижной фазы, вытесне-



ние молекул белка из сорбента лигандным обменом (например, используя имидазол).

Аффинная хроматография широко используется для выделения ферментов, гормонов, антител, антигенов, нуклеиновых кислот, нуклеотидов, клеточных рецепторов и других белковых молекул.

Практическое применение аффинной хроматографии можно рассмотреть на примере получения чистых антител против вируса гриппа или против дифтерийного токсина. При получении антител против дифтерийного токсина через колонку, содержащую целлюлозную матрицу с антигенами, пропускают иммунную сыворотку. Антитела образуют прочные комплексы с антигенами. Затем для удаления неспецифических белков колонку промывают раствором хлорида натрия с массовой долей 0,85 %. Комплекс антиген — антитело разрушают фосфатно-лимонным буферным раствором (рН 3,2).

Другой пример использования аффинной хроматографии — способ получения фермента плазмина, основанный на образовании комплекса плазмина с лизином (лиганд). В этом случае для разрушения комплекса плазмин — лизин применяют раствор с высокой ионной силой.

## ПЛАНАРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

### 4.1. Общая характеристика

Планарная, или плоскостная, хроматография относится к жидкостной хроматографии, так как подвижной фазой является жидкость. Процессы разделения веществ осуществляются в плоском слое сорбента. Основные методы планарной хроматографии:

- тонкослойная хроматография;
- хроматография на бумаге;
- электрохроматография.

Бумажная и тонкослойная хроматографии простые и сходные по технике выполнения экспрессные методы, не требующие дорогостоящего оборудования.

Доступность и относительная дешевизна используемых реактивов и оборудования в сочетании с высокой чувствительностью позволяет широко использовать методы планарной хроматографии для решения различных аналитических задач.

В плоскостной хроматографии разделение компонентов смеси обусловлено переносом компонентов подвижной фазы вдоль слоя неподвижной фазы в соответствии с коэффициентами распределения определяемых компонентов. Различают две группы методов в зависимости от того, под действием каких сил происходит движение элюента: капиллярные силы и внешние силы (рис. 4.1).

Тонкослойная (ТСХ), бумажная и высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) — это методы, в которых движение подвижной фазы происходит под действием капиллярных сил. Методы, в которых к подвижной фазе приложены различные внешние силы: ТСХ под давлением и круговая ТСХ высокого давления, ТСХ под действием центробежной силы (ротационная ТСХ).

Наиболее широко из методов планарной хроматографии в настоящее время применяются методы ТСХ и ВЭТСХ.



Рис. 4.1. Классификация методов планарной хроматографии

## 4.2. Тонкослойная хроматография

Метод тонкослойной хроматографии предложен в 1938 г. Н.А. Измайловым и М.С. Шрайбером, но широкое практическое применение он нашел позже. Значительный вклад в развитие этого метода внес Э. Шталь, который разработал оборудование, показал применимость тонкослойной хроматографии и в 1956 г. написал первое практическое руководство по ее использованию.

Тонкослойную хроматографию используют для обнаружения и количественного определения органических и неорганических веществ в сложных объектах. Анализ состоит из нескольких стадий: подготовка пробы и подготовка пластины, подготовка хроматографической камеры, нанесение пробы, хроматографическое разделение компонентов пробы, удаление элюента с пластины, детектирование, идентификация и количественное определение.

В методе ТСХ могут быть реализованы различные варианты хроматографирования: нормально-фазовый, обращенно-фазовый, мицеллярный и хиральный. Высокоэффективная ТСХ отличается более высокой чувствительностью, эффективностью и скоростью.

#### 4.2.1. Механизмы разделения и выбор элюента

Разделение веществ методом тонкослойной хроматографии протекает по смешанным механизмам. Поскольку ТСХ является разновидностью жидкостной хроматографии, то распределительная хроматография может сопровождаться адсорбционной, и наоборот.

В основе адсорбционной ТСХ лежит конкурентное взаимодействие полярных групп определяемого вещества и молекул растворителя с активными центрами адсорбента. Для элюирования неполярных веществ применяют неполярные элюенты, так как в этом случае неполярные вещества элюируются раньше, чем полярные. Повышение концентрации полярного компонента увеличивает подвижность веществ ( $R_f$ ).

Подбор элюентов обычно проводится с использованием литературных данных. Изменяя состав элюентов, можно регулировать  $R_f$  с учетом типа пластин. Принцип элюотропных рядов дает лишь ориентировочную информацию, так как элюирующая способность растворителя определяется суммой всех сил его взаимодействия с веществом.

В *нормально-фазовой распределительной ТСХ* используют подвижные неполярные фазы и неподвижные полярные фазы (вода, уравновешенная с органическим растворителем). Между этими фазами распределяются хроматографируемые вещества, которые должны быть растворимыми в неподвижной фазе. С увеличением полярности вещества наблюдается увеличение удерживания, а с увеличением полярности элюента удерживание уменьшается.

Распределительная ТСХ осуществляется как на обычных адсорбентах (силикагель, кизельгур, целлюлоза), так и на сорбентах, импрегнированных полярными (ДМСО, ДМФА, этиленгликоль) и гидрофобными соединениями (парафиновое, силиконовое масла, ундекан, тетрадекан). В качестве сорбентов могут использоваться гидрофильные сорбенты с химически связанными фазами (диол-, циан- и амино-фазы) и гидрофобные сорбенты с химически связанными фазами ( $C_2$ ,  $C_8$ ,  $C_{18}$ ).

В *обращенно-фазовой ТСХ* в качестве элюентов используют в основном смеси полярных растворителей: спирты, ацетон, ацетонитрил, диоксан, смешанные с водой в разных соотношениях. Наиболее часто используют смеси метанол — вода и ацетонитрил — вода (табл. 4.1).

Таблица 4.1

**Подвижные фазы в обращенно-фазовой ТСХ**

Тип пластины	Вещества	Подвижные фазы
Диолс-ликагель	Гликозиды наперстянки	Этилацетат — 25%-ный аммиак (100:1)
Нитрил-силикагель	Прогестероны	Петролейный бензин — ацетон (8:2)
Амино-ликагель	Алкалоиды спорыньи	Хлороформ — метанол (100:4)
RP-2 Силикагель C <sub>2</sub>	Пиридазиновые производные	Метанол — вода (7:3); pH 4
RP-8 Силикагель C <sub>8</sub>	Афлатоксин М в молоке	Метанол — вода (20:1)
RP-18 Силикагель C <sub>18</sub>	Алкалоиды Ароматические кислоты Пенициллины	Метанол — 0,5 М NaCl (65:35) Ацетонитрил — 0,5 М NaCl (2:8) Метанол — 0,1 М K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (55:45); pH 8,8

Обращенно-фазовая тонкослойная хроматография применяется для разделения как полярных, так и неполярных веществ.

В ион-парной ТСХ в элюент добавляют гидрофобные соли (противоионы), а при разделении смеси кислот небольшие количества слабых кислот (например, уксусную кислоту); значение pH элюента должно быть меньше значения pH разделяемых кислот.

**4.2.2. Сорбенты**

В качестве неподвижных фаз используются сорбенты, применяемые в колоночной жидкостной хроматографии. Толщина слоя сорбента 200–500 мкм, а размеры частиц — 20 мкм и более. Число теоретических тарелок может достигать 2000 (при длине пути 12 см), время разделения — около 25 мин. Метод ВЭТСХ позволяет производить разделение быстрее (около 10 мин) и более полно; размер зе-

рен 5 мкм и менее, а толщина слоя сорбента – около 100 мкм, число теоретических тарелок достигает 4000 (при длине пути 3 см).

Тонкослойная хроматография выполняется в разных вариантах: слой сорбента может быть незакрепленным и закрепленным. В первом случае пластина устанавливается под углом не более 15–20°, во втором – сорбент смешивается с каким-либо связующим веществом и распределяется тонким ровным слоем на поверхности пластинки (такая пластинка может устанавливаться в камере в любом положении).

В настоящее время в ТСХ используются в основном готовые пластины, выпускаемые различными фирмами. Для приготовления пластин в качестве адсорбентов применяют силикагель и модифицированный силикагель, оксид алюминия, целлюлозу и модифицированную целлюлозу, ионообменные смолы и другие материалы. Адсорбенты могут содержать люминесцентный индикатор.

Пластины для ТСХ состоят из подложки, слоя сорбента и связующего элемента. Подложку изготавливают из стекла, алюминиевой фольги, полимерной пленки. Основные связующие вещества – крахмал, гипс, силикаты щелочных металлов и органические полимеры.

Наиболее универсальным и распространенным адсорбентом в нормально-фазовой ТСХ является силикагель (табл. 4.2, 4.3).

Таблица 4.2

### Основные характеристики силикагелей для ТСХ

Фирма (страна), тип силикагеля	Диаметр пор, нм	Объем пор, мл/г	Удельная поверх- ность, м <sup>2</sup> /г	Фракци- онный со- став, мкм	Толщи- на слоя, мкм	Связующие вещества
«Мерк» (Германия), TLC Si 60	6	0,82	550	2–20	250	Органический полимер
«Ватман» (США), LK5 НРК	8	0,70	300	5–10	200	Органический полимер
«Машерей», «Нагел» (Германия), SILC 25	6	0,75	500	5–25	250	Гипс
«Кавалнер» (Чехия), Силу-фол	6	0,8	500	5–40	100	Крахмал

Окончание табл. 4.2

Фирма (страна), тип силикагеля	Диаметр пор, нм	Объем пор, мл/г	Удельная поверх- ность, м <sup>2</sup> /г	Фракци- онный со- став, мкм	Толщи- на слоя, мкм	Связующие вещества
«Реахром» (Ар- мения), Реах- ром	6	0,8	300	10–20	100	Силика- золь
ПКБ Пластмаш (Россия), Sorb- fil, АТСХ	120– 150	0,8	350	5–20	130	Силика- золь

Таблица 4.3

**Основные характеристики модифицированных силикагелей для ТСХ**

Фирма (страна)	Обозначение	Модифицирующая функциональная группа	Диаметр частиц, мкм
«Мерк» (Германия)	TLC RP-2	C-2	11–13
	TLC RP-18	C-18	11–13
	HP TLC RP-2	C-2	5–7
«Машерей», «Нагел» (Германия)	SILC 18-100	C-18	5–10
	SILC 18-50	C-18	
«Ватман» (США)	K C-2	C-2	10–14
	K C-8	C-8	
	K C-18	C-18	
	K CS 5	Дифенилметил	

Пластины, приготовленные с использованием силиказоля в качестве связующего вещества, отличаются химической стойкостью и высокой механической прочностью. Их можно использовать многократно после обработки хромовой смесью и водой. В качестве детектирующих реагентов можно применять концентрированные кислоты. Особый интерес представляют пластины с силиказолевым связующим для модификации химическими и физическими методами.

Широкое применение в биохимии, клинической и фармацевтической химии находят двухфазные пластины, покрытые двумя

сорбентами. В первой зоне (преадасорбционный слой) происходит очистка и концентрирование пробы, во второй — разделение компонентов смеси. В качестве сорбентов первой зоны могут быть использованы адсорбционно-неактивный сорбент (диатомит или силикагель с диаметром пор 500 нм) или силикагель, модифицированный фазой **RP-18**. Вторая зона пластины покрыта обычным силикагелем. Применение таких пластин позволяет повысить эффективность разделения, а также экономит время.

Для улучшения разделения и последующего селективного детектирования проводят модификацию пластин с помощью химических реакций или импрегнирования их соответствующими реагентами. Наиболее простой способ силанизирования пластин — погружение их в растворы диметилдихлорсилана или гексаметилдисилазана.

Импрегнирование пластин производится погружением их в растворы реагентов (борная кислота, нитрат серебра, пикриновая кислота, соли цинка и кадмия). Гидрофильность или гидрофобность пластин достигается импрегнированием их соответствующими растворителями, например формамидом и полиэтиленгликолем (для гидрофильных фаз), силиконовыми маслами и жидкими парафинами (для гидрофобных).

Иногда перед нанесением проб проводят активацию пластин — нагревание в термостате при 110–120 °С в течение 15–20 мин для удаления влаги. После активации пластины закрывают стеклянной пластиной.

#### 4.2.3. Техника выполнения

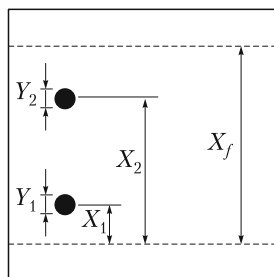
В тонкослойной хроматографии сорбент находится в виде тонкого слоя на стеклянной, металлической или пластмассовой пластине. Небольшой объем (0,5–5,0 мкл) пробы жидкости, содержащей анализируемые вещества, наносят с помощью капилляра, микрокапилляра или микрошприца на линию старта. Линия старта обычно находится на расстоянии 1–2 см от края пластины. В качественном анализе диаметр образующегося пятна не должен превышать 5 мм, а в количественном — он должен быть меньше. Пластины с нанесенным раствором подсушивают для удаления растворителя. Затем помещают в закрытую хроматографическую камеру, в которой находится растворитель (подвижная фаза).



Вследствие действия капиллярных сил растворитель движется вдоль слоя сорбента и переносит компоненты разделяемой смеси с различной скоростью. После хроматографического разделения смеси (слой растворителя находится на 1–2 см ниже верхнего края пластины) пластину вынимают, подсушивают для удаления растворителя и проявляют (рис. 4.2).

Наносят пробу анализируемого вещества на слой сорбента двумя способами: в виде точки и в виде полосы (используется в основном в препаративной хроматографии).

Для получения четких хроматограмм и при количественном определении следует обращать внимание на объем наносимой пробы. В случае малых объемов определяемое вещество может быть не замечено при проявлении. При больших объемах пробы наблюдается значительное размывание и перекрывание пятен. Поэтому предварительно на пластину наносят ряд проб разной величины, хроматографируют и после проявления выбирают оптимальное количество пробы.

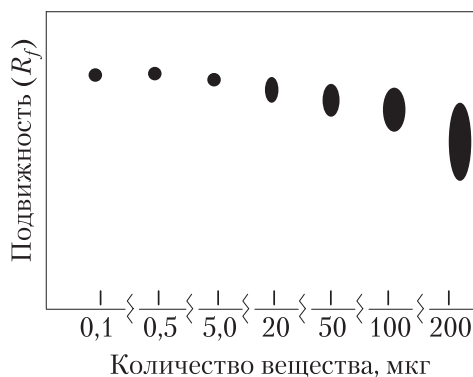


**Рис. 4.2.** Схема тонкослойной хроматограммы:

$X_1$ ,  $X_2$  — расстояние, пройденное зоной вещества до центра зоны;  $Y_1$ ,  $Y_2$  — расстояние от нижней до верхней границы пятна (ширина пятна);  $X_f$  — расстояние, пройденное фронтом растворителя

При больших количествах нанесенного вещества наблюдаются заниженные значения  $R_f$  (рис. 4.3).

Для растворения пробы применяют растворитель, в котором полностью растворяются все ее компоненты. Растворитель должен быстро удаляться (испаряться) с пластины и хорошо смачивать слой сорбента. После нанесения пробы пластины нагревают или подсушивают феном для испарения растворителя.



**Рис. 4.3.** Зависимость значения  $R_f$  и формы пятна от количества нанесенного вещества (на примере глицина)

#### 4.2.4. Хроматографические характеристики

Основной характеристикой хроматографического поведения веществ в ТСХ является *подвижность*, или *коэффициент удерживания* ( $R_f$ ) — отношение расстояния ( $X_n$ ), пройденного зоной вещества от стартовой линии до центра зоны, к расстоянию ( $X_f$ ), пройденному фронтом растворителя от стартовой линии до границы фронта растворителя. Значения  $R_f$  находятся в пределах от 0 до 1, так как  $X_n$  не может быть больше  $X_f$ .

Ф. Гейс указывает 26 факторов, влияющих на качество разделения в ТСХ: сорбент, растворитель, предварительное насыщение системой растворителей («кондиционирование»), диаметр частиц сорбента, размер пятна, относительная влажность, неравномерность качества слоя, скорость поступления растворителя, температура, закрепитель слоя, толщина слоя, наличие примесей в растворе, pH и др.

Величина pH может влиять на хроматографирование веществ, которые диссоциируют в воде. Значение  $R_f$  для таких веществ зависит не только от коэффициента распределения, но и от констант ионизации. Зависимость  $R_f$  от констант ионизации используют в том случае, если у разделяемых веществ близкие значения коэффициентов распределения. Такие соединения разделяют, используя буферные растворы.

Для идентификации веществ, разделенных методом ТСХ, на практике обычно используют относительные значения  $R_f$ :

$$R_{f(\text{отн})} = R_f^x / R_f^{\text{ст}}, \quad (4.1)$$

где  $R_f^x$  и  $R_f^{\text{ст}}$  — подвижность соответственно анализируемого и стандартного вещества.

Зависимость между  $R_f$  и коэффициентом распределения выражается уравнением

$$D = (V_m / V_s)(1/R_f - 1), \quad (4.2)$$

где  $V_m$  и  $V_s$  — объем подвижной и неподвижной фазы.

Число теоретических тарелок  $N$  и величину  $H$  рассчитывают по формулам

$$N = 16(X/Y)^2, \quad (4.3)$$

$$H = L/N = (L/16)(Y/X)^2, \quad (4.4)$$

где  $X$  — расстояние удерживания;  $Y$  — ширина пика.

Критерий разделения (разрешение)

$$R_s = 2\Delta X_{2,1}/(Y_1 + Y_2). \quad (4.5)$$

Селективность (фактора, или коэффициента, разделения) определяют по формуле

$$\begin{aligned} \alpha &= D_2/D_1 = (1/R_{f2} - 1)/(1/R_{f1} - 1) = \\ &= t'_{R2}/t'_{R1} = V'_{R2}/V'_{R1} = k'_2/k'_1. \end{aligned} \quad (4.6)$$

Коэффициент (фактор) емкости

$$k' = t_s/t_m = D(V_s/V_m) = (1 - R_f)/R_f, \quad (4.7)$$

где  $t_s$ ,  $t_m$  — время нахождения вещества в неподвижной (стационарной) и подвижной (мобильной) фазах.

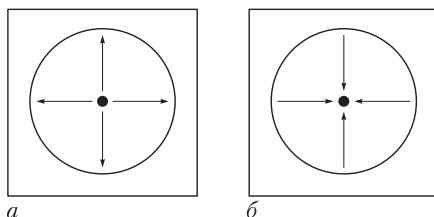
В тонкослойной хроматографии скорость потока подвижной фазы не постоянна и зависит от многих факторов (размер зерен сорбента, вязкость растворителя и др.).

Состав многокомпонентной подвижной фазы по мере ее продвижения по сорбенту непрерывно изменяется, что приводит к плохой воспроизводимости величин  $R_f$ .

#### 4.2.5. Типы элюирования

В зависимости от типа элюирования различают линейную, круговую и антикруговую ТСХ. Вариант линейной хроматографии был рассмотрен ранее (см. 4.2.3).

В *круговой ТСХ* проба и растворитель подаются в центр пластины (рис. 4.4, *а*). После хроматографирования наблюдаются концентрические кольца (рис. 4.5, *а*).

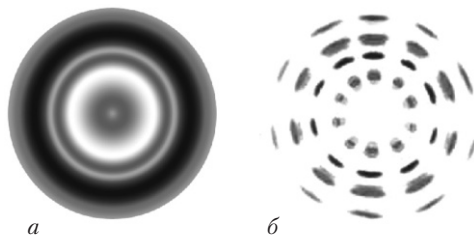


**Рис. 4.4.** Типы элюирования в ТСХ:  
*а* — круговое; *б* — антикруговое

Близкой по технике выполнения является радиальная хроматография: пробы наносят по окружности на некотором расстоянии от центра пластины, элюент подается в центр пластины. После хроматографического разделения получаются дугообразные полосы (рис. 4.5, *б*).

В *антикруговой ТСХ* (рис. 4.4, *б*) пробы наносят по окружности на периферии пластины, а элюент подают в направлении к центру пластины. Основные преимущества антикруговой ТСХ в том, что этот метод наиболее быстрый и позволяет анализировать сразу много проб.

Наиболее простой способ выполнения круговой ТСХ — с использованием чашки Петри, антикруговой — с использованием двух таких чашек.



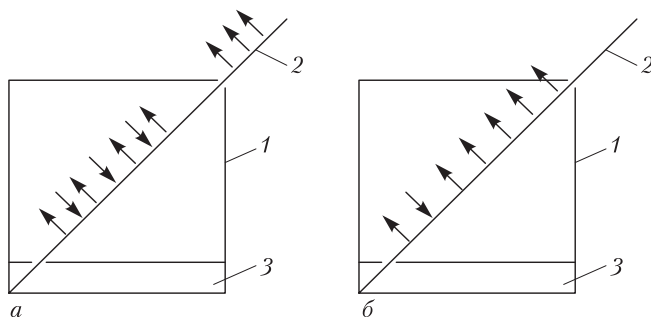
**Рис. 4.5.** Хроматограммы, полученные методами круговой (*а*) и радиальной (*б*) хроматографии

Зависимость между значениями  $R_f$  в линейном варианте разделения и в круговой («центробежной») ТСХ:

$$(R_f)_{\text{лин}} = (R_f)_{\text{цб}}^2. \quad (4.8)$$

Значительное увеличение пиковой емкости достигается при использовании проточной, двумерной и многократной ТСХ.

При **проточной ТСХ** (ПТСХ) элюент непрерывно поднимается по слою сорбента. Верхний конец пластины находится вне камеры, происходит непрерывное испарение растворителя по мере поступления его вверх. Если камера открыта (испарительный вариант ПТСХ), то растворитель испаряется со всей поверхности слоя (рис. 4.6).



**Рис. 4.6.** Схема проведения проточной ТСХ в закрытой (а) и открытой (б) камере: 1 — камера; 2 — пластина; 3 — элюент

При **двумерной ТСХ** (ДТСХ) пробу наносят в левый угол пластины и хроматографируют сначала в одном растворителе или смеси растворителей, пластину высушивают, а затем поворачивают на  $90^\circ$  и хроматографируют в другом элюенте. Перед хроматографированием во втором направлении можно изменять свойства сорбента (пропитка различными реагентами). В некоторых случаях после первого хроматографирования с помощью химических реакций (окисление, восстановление) изменяют свойства разделенных компонентов смеси.

Предложены разные варианты ДТСХ. При использовании двухфазных пластин (с прямой и обратной фазами) разделение компонентов смеси может происходить по разным механизмам в разных направлениях элюирования.

Сущность **многократной ТСХ** (МТСХ) заключается в многократном повторении хроматографического разделения смеси в одном или двух направлениях, в одном или разных элюентах с одинаковым или разным расстоянием элюирования.

Проведение МТСХ на пластинах для ВЭТСХ позволяет оптимизировать разделение сложных смесей, так как дает возможность уменьшить длину пробега и время в каждом цикле. При многократной ТСХ достигается высокая эффективность разделения, эквивалентная  $10^5$  теоретических тарелок.

#### 4.2.6. Способы детектирования

Предложены разные способы детектирования для идентификации определяемых компонентов разделяемой смеси.

Один из наиболее чувствительных методов детектирования — *исследование флуоресцентных свойств разделяемых веществ*. Усилить флуоресценцию веществ можно разными способами. Например, на пластину наносят жидкий азот и освещают ее УФ-светом. Предложены также реагенты для перевода нефлуоресцирующих веществ в флуоресцирующие соединения (см. приложение 8).

*Использование флуоресцентных индикаторов*, которые наносят на сорбент. В этом случае при облучении пластины УФ-светом на светящемся фоне пластины наблюдаются темные пятна определяемых веществ.

*Применение групповых или селективных реагентов*. Например, нингидрин используют как реагент на  $\text{NH}_2$ -группы, а хлорид железа(III) — на фенолы.

Предложены разные способы пред- и постдериватизации исследуемых веществ. Введение хромофоров или флуорофоров повышает чувствительность анализа. Предхроматографическая дериватизация может повысить селективность разделения компонентов смеси, увеличить стабильность, понизить адсорбционную активность, улучшить растворимость и другие свойства разделяемых веществ.

Измерение локального диффузного отражения света в УФ и видимой области проводится с помощью денситометра или сканера.

#### 4.2.7. Количественное определение

В методе ТСХ количественное определение разделенных веществ проводят непосредственно на слое сорбента или эти вещества извлекают из слоя сорбента и анализируют полученный раствор с применением других методов.

Полуколичественное определение вещества можно осуществить по размеру пятна. Более точные результаты количественного определения веществ могут быть получены непосредственно на хроматограммах измерением размера пятна (площади зоны или ее длины) либо инструментальными методами (сканирование пластины после ТСХ), к которым относят оптические, ядерно-физические, электрохимические, ферментативные и др.

В *оптических сканирующих методах* измеряют поглощение, отражение, флуоресценцию и гашение флуоресценции. Наиболее эффективный (высокая чувствительность и селективность) метод количественного анализа — измерение интенсивности флуоресценции веществ в слое сорбента. Для этого метода характерен широкий интервал линейной зависимости количества вещества от интенсивности флуоресценции, который не зависит от формы зоны. Дериватизация веществ до и после ТСХ с превращением их в флуоресцирующие производные расширяет возможности флуоресцентного метода.

Многие фирмы выпускают специальное оборудование для оптического детектирования в ТСХ, например универсальная сканирующая установка фирмы «Оптон» (США), «Цейс» (Германия), сканирующие устройства фирмы «Шимадзу» (Япония). Сканеры фирмы «Камаг» (Швейцария) позволяют измерять поглощение, флуоресценцию, гашение флуоресценции при круговом и антикруговом методах. Оптико-механическое объединение в Санкт-Петербурге (Россия) выпускает прибор, который измеряет интенсивность поглощения или отражения монохроматического света, интенсивность флуоресценции или гашение флуоресценции. Диапазон длин волн соответствует 240–700 нм, предел детектирования поглощающих веществ —  $10^{-8}$  г, флуоресцирующих —  $10^{-10}$  г.

В *ядерно-физических методах* (ЯФМ) в качестве меток используют тритий и применяют эти методы для определения радиоактивно меченных соединений. Различают автораддиографические, иони-

зационные и сцинтилляционные ядерно-физические методы. Для ЯФМ характерны высокая чувствительность, селективность и воспроизводимость.

Возможна количественная оценка веществ в ТСХ с помощью детекторов для газовой хроматографии: после перевода анализируемого вещества в газовую фазу проводят количественное определение с применением катарометра (ПИД, ДЭЗ и др.). Этот метод оптимален для веществ средней летучести.

Электрохимические методы, хотя и отличаются высокой селективностью и быстротой, широкого применения в ТСХ пока не нашли.

### 4.3. Хроматография на бумаге

Хроматограммы на бумаге получают способами, которые аналогичны способам получения хроматограмм в ТСХ. Носителями неподвижной жидкой фазы служат специальные сорта бумаги. Бумага может быть гидрофильной (удерживает воду в своих порах) и гидрофобной (неполярные органические растворители).

К бумаге, применяемой в хроматографии, предъявляются определенные требования:

- она должна быть химически чистой и нейтральной;
- не адсорбировать анализируемые вещества;
- быть однородной по составу и строению волокон (длина волокон от 0,5 до 3 мм).

Для хроматографии наиболее подходит *«линтерная» бумага*, не содержащая веществ, растворимых в воде. Линтерная целлюлоза – это высокомолекулярный полисахарид, содержащий 2500–3000 остатков глюкозы в макромолекуле.

При получении химически чистой бумаги товарные образцы обрабатывают реагентами, которые с неорганическими ионами образуют комплексные соединения, вымываемые затем растворителями. Такими реагентами могут быть трилон Б, 8-оксихинолин, аминокислота.

Хроматографическая бумага должна содержать определенное количество неподвижной фазы. *Гидрофильная бумага* обычно содержит 20–22 % воды, которая выполняет роль неподвижной



фазы. Подвижной фазой в этом случае служат органические водонерастворимые растворители. Гидрофильная бумага применяется для анализа водорастворимых веществ.

**Гидрофобную бумагу** получают при специальной обработке гидрофильной бумаги. В качестве реагентов для обработки используют: 1%-ный раствор парафина в петролейном эфире; 0,5%-ный раствор каучука в бензоле и др. Получение хроматографии на гидрофобной бумаге применяется при анализе веществ, нерастворимых в воде, и носит название метода обращенных фаз. Неполярный растворитель служит неподвижной фазой, а полярный (водные растворы спиртов, органических кислот) – подвижной.

Скорость движения разделяемых веществ определяется коэффициентами распределения ( $D$ ): чем меньше величина  $D$ , тем быстрее вещество передвигается по бумаге. Определить  $D$  экспериментально довольно сложно, так как для этого надо знать концентрации веществ в подвижной и неподвижной фазах. Поэтому основной характеристикой удерживания вещества является подвижность.

Подвижность разделяемых веществ зависит от сорта бумаги и направления волокон на ней, техники исполнения, концентрации разделяемых веществ и других факторов. Поэтому использование табличных значений  $R_f$  не позволяет надежно идентифицировать разделяемые компоненты.

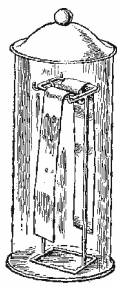
Основными способами получения хроматограмм на бумаге являются восходящий и нисходящий.

На хроматографическую бумагу на линию старта наносят анализируемую смесь и помещают бумагу вертикально в хроматографическую камеру. Слой растворителя должен быть ниже линии старта. После хроматографического разделения бумагу вынимают, подсушивают и проявляют. Так получают восходящую хроматограмму.

При использовании нисходящего способа хроматографическую бумагу с нанесенной смесью веществ укрепляют сверху в хроматографической камере и помещают в стеклянную желобообразную кювету с подвижной фазой (рис. 4.7).



Рис. 4.7. Стеклянная кювета для хроматографии на бумаге



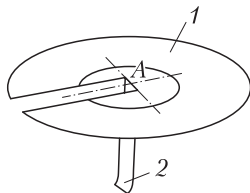
**Рис. 4.8.**

Установка  
для нисходя-  
щей хрома-  
тографии

На дне камеры, которая герметически закрывается, находятся растворители, входящие в состав подвижной фазы. В кювету можно погружать два листа хроматографической бумаги так, чтобы они свешивались внутри цилиндрической или прямоугольной камеры параллельно друг другу (рис. 4.8).

Под действием капиллярных сил растворитель и одновременно с ним компоненты разделяемой смеси и стандартные вещества постепенно смещаются вниз. Продолжительность хроматографического разделения в зависимости от длины бумаги и состава разделяемой смеси составляет 12–24 ч. После разделения первичную хроматограмму вынимают из камеры и на 15–20 мин помещают в сушильный шкаф.

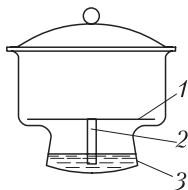
При получении *круговой хроматограммы* исходную смесь наносят в центр круга и она распределяется концентрическими кольцами от центра к периферии. Подвижную фазу в центр круга на бумаге подают с помощью капельной воронки и фитиля, опущенного в сосуд с подвижной фазой (рис. 4.9).



**Рис. 4.9.** Форма бумаги для получения круговой хроматограммы:  
А — место нанесения пробы; 1 — бумажный фильтр; 2 — вырезка  
из бумаги (фитиль) для подачи подвижной фазы

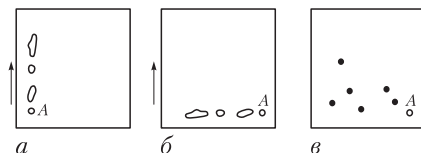
В качестве хроматографической камеры для получения круговой хроматограммы можно использовать эксикатор, на дне которого находится подвижная фаза (рис. 4.10).

Для получения *двумерной хроматограммы* исследуемый раствор наносят на бумагу в ее левом углу на расстоянии 5 см от краев (рис. 4.11, а). После высушивания бумагу помещают в хроматографическую камеру с подвижной фазой, где происходит хроматографирование восходящим способом. После хроматографического



**Рис. 4.10.** Схема прибора для получения круговой хроматограммы:  
1 — бумажный фильтр; 2 — фитиль; 3 — подвижная фаза

разделения бумагу высушивают и поворачивают на  $90^\circ$  против часовой стрелки, при этом место нанесения капли исследуемого раствора окажется справа (рис. 4.11, б). Затем бумагу снова помещают в хроматографическую камеру, содержащую подвижную фазу другого состава, и хроматографируют по восходящему методу. После достижения подвижной фазой заданной высоты бумагу вынимают, подсушивают и проявляют.



**Рис. 4.11.** Схема получения двумерной хроматографии:  
а — первая хроматограмма; б — хроматограмма перед опусканием во вторую подвижную фазу; в — вторая хроматограмма (смесь из шести компонентов разделилась)

**Электрофоретическая хроматография** — прием, в котором хроматографирование проводят после воздействия электрического тока на разделяемую смесь. В этом случае на бумагу, пропитанную раствором электролита, наносят каплю анализируемого раствора и закрепляют ее между электродами источника постоянного тока. После электрофореза бумагу вынимают из прибора, сушат и хроматографируют, используя метод восходящей или нисходящей хроматографии. Затем бумагу проявляют.

В качестве хроматографической камеры можно использовать любой герметически закрывающийся сосуд: высокий стакан, эксикатор, чашки Петри (для круговой хроматографии).

Хроматограммы, полученные на бумаге, обычно бывают бесцветными. Для их проявления используют различные реагенты,

образующие окрашенные соединения с компонентами анализируемой смеси. Если определяемое вещество способно флуоресцировать, то наблюдают флуоресценцию в УФ-свете.

Проявитель наносят на бумагу с помощью пульверизатора. Часто в качестве проявителя используют пары иода, которые с органическими веществами образуют продукты, окрашенные в желто-коричневый или синий цвет. Предложен метод автордиографии, который состоит в том, что к хроматограмме, содержащей радиоактивные изотопы, прикладывают рентгеновскую пленку или фотопленку. На полученном отпечатке хроматограммы зоны определяемых веществ имеют вид темных пятен.

В тех случаях, когда после проявления хроматограммы наблюдается одинаковое окрашивание всех зон веществ, применяют *метод «свидетелей»*: параллельно с каплей анализируемого раствора на хроматографическую бумагу наносят каплю смеси известных веществ, а после проявления сравнивают положение пятен компонентов анализируемой смеси с положением пятен известных веществ. Однако это громоздкий и длительный метод, требующий набора чистых веществ.

Лучшим является *метод измерения  $R_f$* , однако все анализы следует проводить в строго определенных и одинаковых условиях. Основной недостаток этого метода — зависимость  $R_f$  от плотности бумаги и направления ее волокон, а также от ряда других трудноучитываемых факторов.

Кроме того, между параметром  $R_f$  и основными параметрами плоскостной хроматографии нет линейной зависимости. Линейностью обладает константа  $R_m$ , предложенная в 1950 г. Е. Бейт-Смитом и Р. Уэсталлом:

$$R_m = \lg [(1 - R_f)/R_f]. \quad (4.9)$$

Эта константа характеризует термодинамические свойства молекулы вещества, выделенного методом распределительной хроматографии; константа  $R_m$  — аддитивная величина констант, характеризующих определяемое вещество и растворитель. Зная  $R_m$ , можно предвидеть значения  $R_f$  для данного вещества и определять структуру его молекул. Для данного сорта бумаги и данного растворителя значение  $R_m$  постоянное. Для идентификации вещества  $R_m$  необходимо определять, используя одну и ту же бумагу с раз-

ными растворителями. В литературе [9] встречаются и другие варианты определения  $R_m$ :

$$R_m^x = \lg [R_f / (1 - R_f)], \quad (4.10)$$

$$^e R_m = \ln [(1 - R_f) / R_f]. \quad (4.11)$$

Величины  $R_m$  и  $R_m^x$  отличаются только знаком:  $R_m = -R_m^x$ . Значение  $^e R_m$  в 2,3 раза больше значения  $R_f$ .

**Количественное определение веществ**, разделенных хроматографией на бумаге, можно проводить двумя способами.

*Первый способ* основан на предположении, что между площадью пятна ( $S$ ) и концентрацией анализируемого вещества имеется линейная зависимость:

$$S = a \lg c + b, \quad (4.12)$$

где  $a$ ,  $b$  — константы;  $c$  — концентрация.

Предварительно строят градуировочный график в координатах  $S - \lg c$ . Для этого на бумагу наносят разные известные количества вещества, подлежащего определению. Хроматографируют, проявленные пятна очерчивают карандашом и определяют их площадь. После этого содержание вещества находят по графику или рассчитывают по уравнению градуировочного графика. Численные значения коэффициентов  $a$  и  $b$  находят методом наименьших квадратов. Необходимо соблюдать одинаковые условия при калибровке и проведении анализа. Погрешность определения описанным способом составляет  $\pm 5-10\%$ .

Более точным является измерение интенсивности окрашивания пятна, осуществляемое с помощью денситометра. Предварительно строят градуировочные графики для каждого вещества, измеряя денситометром интенсивность светового потока, проходящего через хроматограмму.

*Второй способ* количественного определения веществ основан на извлечении (элюировании) хроматографируемых веществ с помощью растворителя, проходящего через бумагу в случае нисходящего способа хроматографирования. Возможен и другой вариант элюирования веществ: бумагу разрезают на части, соответствующие каждому пятну, и проводят экстракцию веществ подходящим

растворителем. Содержание анализируемых веществ в полученных растворах определяют обычными аналитическими методами (спектрофотометрия, флуориметрия и др.).

Метод хроматографии на бумаге относится к современным универсальным методам разделения многокомпонентных смесей неорганических и органических веществ, широко применяется во всех областях радиохимического анализа.

Применение хроматографии на бумаге несколько уступает методу ТСХ, хотя также применяется для разделения органических веществ.

Экспрессность, малая трудоемкость, простота обнаружения веществ на хроматограммах позволяют широко применять этот метод в геохимических и геологических исследованиях. Предел обнаружения метода составляет  $10^{-6}$  г, а в ряде случаев по отношению к ионам металлов чувствительность достигает  $10^{-8}$  г.

# СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Газовая и жидкостная хроматографии имеют определенные достоинства и недостатки и применяются для решения конкретных аналитических задач. Однако известно много веществ, которые не могут быть определены ни методом газовой (нелетучи), ни методом жидкостной хроматографии (отсутствует способ детектирования). В таких случаях возможно применение метода сверхкритической (субкритической) флюидной хроматографии (СФХ), в котором подвижной фазой является флюид (флюидная фаза).

Для любого вещества существуют некоторая критическая температура и соответствующее ей критическое давление, т.е. критическая точка, вблизи которой вещество находится в сверхкритическом (флюидном) состоянии. Свойства вещества в таком состоянии отличаются от свойств и газа, и жидкости. К основным свойствам вещества в сверхкритическом состоянии относятся плотность, вязкость и коэффициенты диффузии. Например, сверхкритические флюиды имеют достаточно высокую плотность ( $0,2-0,5 \text{ г/см}^3$ ), что позволяет использовать их для растворения некоторых нелетучих веществ большой молекулярной массы (нормальные алканы, имеющие от 5 до 40 атомов углерода, полициклические ароматические углеводороды).

Величины критических температур и давлений (табл. 5.1) находятся в пределах рабочих диапазонов для газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии, что не требует значительных изменений в конструкции хроматографов.

Особенности свойств сверхкритических флюидов используют и для сверхкритической флюидной экстракции в процессе пробоподготовки. Например, в промышленности для извлечения кофеина из кофе и никотина из табака используется сверхкритическая флюидная экстракция.

В колонках флюидного хроматографа должны поддерживаться температура и давление, соответствующие сверхкритическому состоянию подвижной фазы. Необходимость высокой точности

контроля давления в системе связана с тем, что плотность флюида в значительной степени зависит от давления. С повышением давления в колонке увеличиваются плотность и элюирующая способность флюида, что и является причиной уменьшения времени удерживания. Например, повышение давления флюида  $\text{CO}_2$  от 7 до 9 МПа приводит к уменьшению времени удерживания с 25 до 5 мин.

Таблица 5.1

**Критические величины некоторых подвижных фаз в СФХ**

Флюид	$T_{\text{к}}, ^\circ\text{C}$	$P_{\text{к}}, \text{МПа}$	$d_{\text{к}}, \text{г/см}^3$
$\text{CO}_2$	31,3	7,39	0,468
$\text{N}_2\text{O}$	36,5	7,27	0,457
$\text{NH}_3$	132,5	11,40	0,235
Метанол	239,4	8,10	0,272
<i>n</i> -Бутан	152	3,80	0,228
Дихлордифторметан	111,8	4,12	0,558
Диэтиловый эфир	195,6	3,64	0,265

Постоянное давление поддерживается с помощью специальных устройств — рестрикторов. Для сброса давления служат устройства, называемые дросселями.

Наиболее часто в качестве флюида применяется диоксид углерода, так как он не токсичен, не поглощает в УФ-области до 190 нм, не имеет запаха, не воспламеняется. Изменение свойств подвижной фазы возможно при добавлении некоторых модификаторов (метанол или диоксан).

Неподвижная фаза может находиться в набивной или в капиллярной колонке. Внутренний диаметр набивных колонок от 0,5 до 4,6 мм, длина до 25 см, они содержат частицы размером от 3 до 10 мкм.

В капиллярных колонках, изготовленных из плавленого кварца, на внутренней поверхности находится тонкая жидкая пленка. Размер колонок: длина — 10–20 м, внутренний диаметр — до 10 мм, толщина слоя неподвижной фазы — от 0,05 до 1 мкм.

В СФХ в качестве детекторов применяются пламенно-ионизационные, фотометрические в УФ- и ИК-области, флуоресцентные, ДЭЗ, катарометры и др. Условием применимости ПИД



является низкая величина фонового сигнала, что характерно при использовании в качестве подвижной фазы  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  или  $\text{NH}_3$ . Масс-спектрометрическое детектирование в СФХ применяется более широко, чем в жидкостной хроматографии, так как технически проще реализовать сочетание хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования.

В СФХ по сравнению с ВЭЖХ достигаются более высокие скорости потоков подвижной фазы, поскольку вязкость флюидов меньше, чем жидкостей. Это приводит к сокращению времени анализа.

Сравнение зависимостей ВЭТТ от линейной скорости потока подвижной фазы (диоксид углерода) для ВЭЖХ и СФХ показывает, что при одной и той же скорости потока ВЭТТ для СФХ в 3 раза меньше. Чем меньше ВЭТТ, тем выше эффективность колонки и может быть достигнуто лучшее разделение. При одинаковых условиях хроматографические пики в СФХ в 1,7 раза уже, чем в ВЭЖХ.

Подвижная фаза в СФХ, в отличие от газовой хроматографии, не является инертной средой и взаимодействует с определяемым веществом. Для целенаправленного изменения величин коэффициентов селективности изменяют состав подвижной фазы.

Методом СФХ возможно определение веществ при температурах более низких, чем температуры испарения, так как в сверхкритических фазах вещества имеют более высокую растворимость. Этот факт позволяет использовать метод СФХ для определения синтетических и биологических полимеров, различных термически нестабильных соединений.

Сверхкритическая флюидная хроматография находит применение при анализе различных типов соединений: лекарственных средств, продуктов питания, взрывчатых веществ, нефти и др. Низкая вязкость сверхкритических флюидов позволяет проводить разделения методом СФХ значительно быстрее, чем методом жидкостной хроматографии.

# ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

## 6.1. Аппаратура

В анализе сложных объектов широко применяется хромато-масс-спектрометрия, сочетающая хроматографию с одним из наиболее информативных методов определения структуры органических соединений — масс-спектрометрией.

Масс-спектрометрия, согласно определению лауреата Нобелевской премии по химии Д. Фенна, «...это искусство измерения атомов и молекул с целью определения их молекулярной массы. Суть данного метода заключается в превращении нейтральной молекулы в ионы...»

Основные этапы развития в области масс-спектрометрии: определение отношения массы электрона к заряду (1898, Дж.Д. Томсон), создание первого масс-спектрометра (1912, Дж.Д. Томсон), создание первого газового (1953–1959) и первого жидкостного хромато-масс-спектрометра (1974–1980), получение первого масс-спектра молекулы белка — инсулина (1981). Крупным достижением последних лет считается создание электростатической ионной ловушки (1999, А. Макаров). За разработку двух мягких методов десорбции и ионизации для масс-спектрального исследования биологически активных молекул в 2002 г. Д. Фенн и К. Танака получили Нобелевскую премию по химии.

Основное отличие масс-спектрометрии (МС) от других спектральных методов состоит в том, что в МС детектируются частицы вещества, а в оптических методах — излучение или поглощение энергии молекулами и атомами.

Хромато-масс-спектрометрия дает исследователю широкие возможности при анализе сложных многокомпонентных смесей, при определении примесей и проведении скрининговых анализов. Современные хромато-масс-спектрометрические системы включают весь богатый арсенал средств газовой и жидкостной хроматографий и масс-спектрометрии: хроматографические капиллярные колонки

высокого разрешения; жидкостную хроматографию с обращенными фазами, реагентами в виде ионных пар, буферными растворами; масс-спектрометрию высокого разрешения; методы мягкой ионизации для анализа термически нестабильных и нелетучих веществ; масс-спектрометрию положительных и отрицательных ионов; масс-спектрометрию метастабильных ионов.

Любой хромато-масс-спектрометр включает три основные части: хроматограф (обычно газовый или жидкостный), масс-спектрометр и интерфейс — специфический узел, обеспечивающий соединение и совместную работу хроматографических и масс-спектрометрических приборов.

### 6.1.1. Хроматографы

**Хроматограф** в хромато-масс-спектрометрической системе служит для разделения исследуемой смеси на отдельные компоненты, которые затем анализируются в масс-спектрометре, выполняющем роль детектора.

Во многих хромато-масс-спектрометрических системах используются капиллярные колонки. Дезактивация стеклянных капилляров путем силилирования или покрытия слоем  $\text{BaCO}_3$  позволяет получать колонки с неполярной фазой с рабочей температурой до  $350^\circ\text{C}$ . Капиллярные колонки из плавленого кварца обеспечивают высокую воспроизводимость, имеют инертную поверхность. В то же время они достаточно гибкие, что дает им преимущество перед хрупкими стеклянными колонками.

Широкое применение нашли три типа капиллярных колонок: классические колонки, в которых жидкая фаза покрывает внутреннюю стенку колонки в виде тонкой пленки (wall coated open tubular columns, WCOT); колонки, в которых разными способами обеспечивается увеличение внутренней поверхности без уменьшения газового объема, эти колонки обозначаются общим термином — porous layer open tubular columns (PLOT). Наилучшими являются колонки, внутренняя поверхность которых покрыта частицами пористого носителя размером порядка нескольких микрон с нанесенной на него жидкой фазой (support coated open tubular columns, SCOT).

В качестве газа-носителя можно использовать любой газ, который соответствует определенным требованиям: инертность, чисто-

та, совместимость с используемым масс-спектрометром и сепаратором.

Использование в качестве хроматографического детектора масс-спектрометра ограничивает круг возможных неподвижных фаз по сравнению с другими видами детекторов, потому что они должны обладать пониженной упругостью паров, более высокой термической стабильностью, пониженным содержанием летучих примесей. Наиболее применяемыми в ГХ-МС жидкими неподвижными фазами являются метилсиликоны, фенилметилсиликоны, фторсиликоны, цианосиликоны.

В ВЭЖХ используют колонки сравнительно небольших размеров: длина 10–30 см, внутренний диаметр 2–4 мм, размер частиц адсорбента 2–10 мкм. Для создания достаточного потока жидкости через такие плотно упакованные колонки необходимо высокое давление (1–40 МПа). ВЭЖХ обеспечивает высокую разделительную способность — более 10 000 теоретических тарелок, сравнительно короткое время анализа (измеряется минутами) и высокую разрешающую способность.

В последнее время в ВЭЖХ находят все большее применение микроколонки или капиллярные колонки, которые могут обеспечить очень высокую эффективность разделения сложных смесей и сокращают расход подвижной фазы.

В ВЭЖХ применяют как полярные, так и неполярные подвижные фазы. Полярные подвижные фазы (чаще всего смесь метанола и ацетонитрила с водой) обычно используют в сочетании с неполярными или слабополярными неподвижными фазами. Неподвижной фазой в этом случае обычно служит силикагель с привитой фазой, например, при реакции с октадецилсиланами.

### 6.1.2. Масс-спектрометры

**Масс-спектрометр** — прибор для измерения отношения массы фрагмента к его заряду. Анализируемые вещества в масс-спектрометре ионизируются с образованием ионов, которые распределяются в зависимости от отношений массы к заряду.

Масс-спектрометры имеют широкий динамический диапазон: от 5–6 порядков для анализа веществ органической природы до 9–10 порядков для элементного анализа веществ.

Соотношение величины сигнала детектора и интенсивности систематических помех, равное 3:1, считается значимым и обозначается как сигнал/шум.

Молекулярный ион или его фрагмент, присутствующий в масс-спектре, обозначается как *характеристический ион*.

В масс-спектрометре четыре основных узла: система ввода образцов, ионный источник (источник ионизации), масс-анализатор и система детектирования ионов (рис. 6.1), а также система создания и измерения вакуума.



Рис. 6.1. Схема масс-спектрометра

**Ввод образца** осуществляют разными способами в зависимости от вида образцов и типа анализа. Образцы для масс-спектрального анализа могут быть газообразными, жидкими и твердыми, для них в современных приборах предусмотрены соответствующие системы ввода. Прямой ввод вещества в камеру ионизации осуществляется в том случае, если образец невозможно проанализировать хроматографическими методами. Наиболее распространенный способ ввода образцов осуществляется с помощью газовой хроматографии.

Масс-спектрометр может иметь несколько систем ввода, которые действуют либо по очереди, либо одновременно, например, при вводе анализируемого образца и стандарта или анализируемого вещества и газа-реагента для химической ионизации. Существенным требованием к системам ввода является возможность их быстрой очистки от остатков или продуктов превращения предшествующего образца, а также химическая инертность.

Система для ввода жидких образцов представляет собой резервуар из нержавеющей стали, стекла или тугоплавкого металла, покрытого эмалью для уменьшения возможности химического взаи-

модействия анализируемого вещества со стенками резервуара, нагреваемого до 250–300 °С.

Для ввода газохроматографических элюатов предназначены две отдельные системы: одна (для набивных колонок) обеспечивает удаление большей части газа-носителя с помощью специального молекулярного сепаратора, другая служит для непосредственного соединения с капиллярными колонками, из которых поток элюата целиком направляется в масс-спектрометр.

**Источник ионизации** предназначен для генерирования ионов из молекул анализируемых веществ и формирования ионного пучка для последующего анализа ионов по массам. Существуют разные методы ионизации: бомбардировка пучком электронов, ионов или нейтральных атомов; ионно-молекулярные реакции (протонирование, депротонирование, катионизация); ионизация в сильном неоднородном электрическом поле, в электрическом разряде; ионизация лазерным пучком; термоионная эмиссия и др. При выходе из ионизатора частицы пробы находятся в основном в виде положительно заряженных ионов, которые затем ускоряют и разделяют.

В ионном источнике с *электронной ионизацией* нейтральные молекулы анализируемого вещества в газовой фазе бомбардируются пучком электронов определенной энергии, испускаемых раскаленным катодом и ускоряемых до заданной энергии. Молекулы теряют электроны и приобретают заряд. Положительные ионы, образующиеся из молекул при электронном ударе, вытягиваются из зоны ионизации и формируются в пучок, который ускоряется до энергий обычно 1–10 кэВ и направляется в масс-анализатор. Метод применяется при ионизации неполярных низкомолекулярных веществ.

При *химической ионизации* ионы образуются в результате ионно-молекулярных реакций между нейтральными молекулами образца и ионной плазмой газа-реагента (метан, бутан, аммиак) при давлении в ионном источнике до 130 Па и парциальном давлении образца до 1 Па. Ионы газа-реагента, полученные при его бомбардировке электронами с энергией 100–500 эВ, взаимодействуют с молекулами анализируемого вещества с образованием как положительных, так и отрицательных ионов. Для образования отрицательных ионов в структуре анализируемого вещества должны быть заместители с высоким сродством к электрону (галогены, нитрофенильные группы и др.).

Сравнительно новым и очень перспективным является метод *ионизации при атмосферном давлении* (ИАД). В этом случае ионно-молекулярные реакции проходят в слабоионизированной плазме инертного газа (обычно азота или аргона) при атмосферном давлении вне вакуумной системы масс-спектрометра. Ионизация инертного газа осуществляется обычно  $\beta$ -излучением, испускаемым  $^{63}\text{Ni}$ . Химическая ионизация при атмосферном давлении применяется при анализе как полярных, так и неполярных веществ (лекарственные вещества, пестициды). Метод применим как в режиме положительных (протонирование исследуемых веществ), так и отрицательных ионов.

*Фотоионизация при атмосферном давлении* — новый метод, появившийся в XXI в. Поток элюата из колонки попадает в ионизационную камеру и облучается УФ-светом. Мощность облучения должна превышать потенциал ионизации исследуемых веществ, но не должна влиять на растворители и воду.

Большое развитие получили методы ионизации нелетучих или термически нестабильных соединений. Это, главным образом, десорбционные методы, позволяющие осуществлять ионизацию непосредственно из твердой фазы.

При *полевой ионизации* (ПИ) и *полевой десорбции* (ПД) пробу ионизируют на эмиттере (вольфрамовая проволока, покрытая пиролитическим углеродом) под действием высокого напряжения. В результате ионизации образуются главным образом молекулярные ионы, а степень фрагментации невелика. Полевая десорбция является развитием метода полевой ионизации; при ПД не обязательно, чтобы ионизируемый образец находился в газообразном состоянии. Образец наносят на активированный эмиттер, помещенный в сильное неоднородное электрическое поле. Эмиттер медленно нагревается электрическим током.

*Лазерная десорбционная ионизация* имеет ряд преимуществ перед другими десорбционными методами: молекулярные и квазимолекулярные ионы с высокой вероятностью образуются даже из термически лабильных и нелетучих молекул; вероятности образования отрицательных и положительных ионов примерно равны; электрическая проводимость образца не оказывает влияния на эффективность ионизации; практически не требуется подготовка образца для качественного анализа; количество энергии, сообщаемой

данному объему ионизируемого образца, можно легко контролировать, регулируя таким образом степень фрагментации.

При лазерной десорбции образуются преимущественно четно-электронные квазимолекулярные ионы, в отличие от масс-спектрометрии вторичных ионов, когда наблюдаются преимущественно молекулярные  $M^+$ -ионы.

Десорбционные методы ионизации наиболее часто применяются при исследовании веществ с молекулярными массами порядка 10 000, при этом для ионизации используют УФ-лазер с  $\lambda = 337$  нм.

*Электрораспыление (электроспрэй)* как источник ионизации был предложен еще в 60-х гг. XX в. Наиболее удачно этот метод сочетается с ВЭЖХ. При введении жидких проб в масс-спектрометр подвижная фаза подается в капилляр, который заканчивается иглой. Высокое ( $\sim 6$  кВ) напряжение, подаваемое на иглу, способствует образованию аэрозоля, который движется к противоэлектроду, при этом теряется растворитель и образуются микрокапли, содержащие одну заряженную частицу. Качество результатов зависит от выбора растворителя для подвижной фазы, который должен быть легколетучим, хорошо растворять анализируемые вещества и способен отдавать протоны. Такими растворителями являются метанол, смеси воды с метанолом и ацетонитрилом.

Эффективность образования ионов анализируемого вещества значительно повышается при уменьшении скорости потока подвижной фазы (метод наноэспрей).

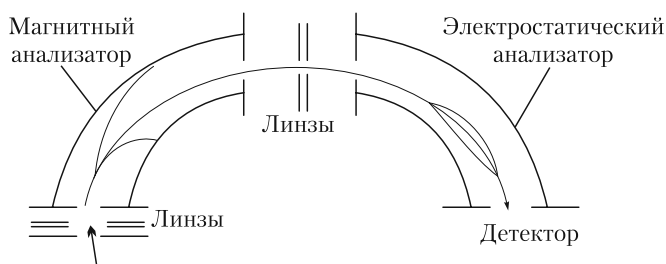
Ионы, образовавшиеся в ионном источнике, ускоряются и фокусируются, после чего ионный пучок поступает в **масс-анализатор**, где ионы разделяются по величинам  $m/z$ , образуя масс-спектр.

Характеристики анализатора очень важны для хромато-масс-спектрометра, потому что он определяет такие важные параметры, как диапазон измеряемых масс, разрешающая способность, скорость сканирования масс-спектров, точность определения и др. Современные приборы имеют разрешение от 500 до 500 000 в зависимости от поставленной задачи.

В хромато-масс-спектрометрических системах используются главным образом два типа анализаторов: с секторным магнитным полем и квадрупольные масс-анализаторы.



В *магнитном секторном анализаторе* ионы при помощи электродов и ускоряющего поля попадают в магнитный сектор анализатора, где происходит фокусировка в соответствии с их массами. Для улучшения фокусировки ионов и получения более высокой разрешающей способности применяются анализаторы с двойной фокусировкой. В этом случае к магнитному анализатору добавляется электростатический, обеспечивающий фокусировку ионов по энергиям. Электростатический анализатор представляет собой секторный конденсатор с радиальным электрическим полем. Имеются два основных типа масс-спектрометров с двойной фокусировкой, отличающихся взаимным расположением магнитного и электростатического анализаторов. Масс-спектрометры с двойной фокусировкой позволяют достичь разрешения порядка 100 000 (рис. 6.2 ).

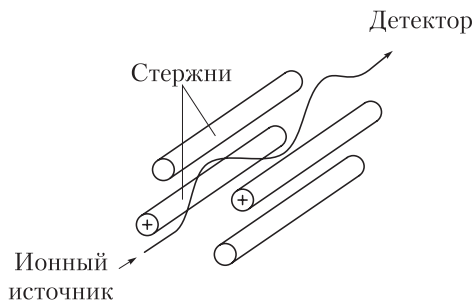


**Рис. 6.2.** Схема масс-анализатора с двойной фокусировкой

*Квадрупольные масс-анализаторы*, или *квадрупольные масс-фильтры*, содержат четыре параллельных стержня. Из них два противоположных электрически соединены между собой, а два других имеют противоположную по знаку компоненту постоянного тока (рис. 6.3). Через высокочастотное электрическое поле проходят только ионы с определенным отношением  $m/z$  (резонирующие ионы), которые затем детектируются. Квадрупольные масс-анализаторы менее чувствительны, чем приборы с магнитным полем (с двойной фокусировкой).

Наряду с диапазоном масс и разрешающей способностью, важной характеристикой масс-анализатора является чувствительность. В режиме селективного детектирования отдельных ионов квадрупольные и магнитные масс-спектрометры достигают предельной чувствительности в несколько пикограммов на 1 мкл об-

разца, введенного в газовый хроматограф. При регистрации полного масс-спектра предел обнаружения составляет несколько сот пикограммов в зависимости от природы образца.



**Рис. 6.3.** Схема квадрупольного масс-анализатора

Для хромато-масс-спектрометрического анализа важна возможность цифрового управления, обеспечивающая высокую производительность и автоматизацию работы. В этом отношении квадрупольный масс-фильтр имеет значительные преимущества перед магнитным анализатором благодаря линейной шкале масс и низкому ускоряющему потенциалу (около 10 В по сравнению с несколькими киловольтами в магнитных масс-спектрометрах). Следует также отметить, что квадрупольный масс-фильтр очень удобен для регистрации отрицательных ионов, так как в нем нет различий между ионами по полярности.

Из других масс-анализаторов следует отметить времяпролетный анализатор и электростатическую ионную ловушку.

Принцип работы *времяпролетного анализатора* основан на том, что скорость разогнанных ионов обратно пропорциональна их массам. Все ионы, попавшие в анализатор, доходят до детектирующей системы.

В *электростатической ионной ловушке* через систему ионной оптики ионы попадают в линейную квадрупольную ловушку, частота осцилляций ионов в ловушке зависит от отношения массы к заряду. Этот анализатор совмещает лучшие качества анализатора по диапазону масс, чувствительности и разрешающей способности.

Первыми **детекторами** ионов были фотопластинки (темные места соответствовали отсутствию ионов, а светлые — местам, в которые попадали пучки ионов).

К основным современным детекторам относятся электронный умножитель, в котором происходит многократное усиление сигнала (до  $10^6$  раз), и сцинтилляционный счетчик (фотоумножитель). В фотоумножителе положительные ионы с энергией 1–10 кэВ выбивают из первого динода (электрод, обладающий высоким коэффициентом вторичной электронной эмиссии) вторичные электроны. Эти электроны ускоряются до энергии  $\sim 100$  эВ и, ударяясь о поверхность следующего динода, выбивают большее количество электронов по сравнению с падающими на динод. Этот процесс повторяется 10–20 раз.

Диноды в умножителях либо расположены отдельно друг от друга, либо представляют собой непрерывные электроды типа «каналтрона». Умножители с отдельными динодами, по сравнению с каналтроном, имеют меньший уровень шумов и больший динамический диапазон. Максимальное усиление умножителя обычно около  $10^6$ . Большее усиление ухудшает линейность и уменьшает время жизни умножителя.

Все хромато-масс-спектрометрические системы, как правило, обеспечивают непрерывную регистрацию части ионного пучка с помощью специального электрода, называемого монитором пучка или монитором интегрального спектра. Монитор пучка непосредственно измеряет ионный ток, который служит для регистрации масс-хроматограммы, а также для оценки условий работы и юстировки ионного источника, для фиксации входа в источник элюируемых хроматографических пиков, а в приборах с фоторегистратцией — для определения экспозиции. В современных приборах используются разные методы регистрации ионного пучка.

**Проведение анализа.** При применении масс-спектрометра важным этапом является калибровка прибора с использованием веществ сравнения. Обычно для калибровки применяют перфторкеросин  $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_n-\text{CF}_3$ , гектакозафтортрибутиламин, а также в зависимости от используемых методов ионизации — иодид цезия, ацетат аммония, полипропиленгликоль, растворы миоглобина и низших пептидов в пропиленгликоле. Внешний стандарт используют обычно для калибровки приборов с низким и средним разрешением. Для приборов высокого разрешения калибратор и аналит вводятся вместе в ионный источник.

Следующий этап анализа — определение молекулярной массы, элементного состава и структуры вещества. Интерпретация пиков в масс-спектре — весьма сложный процесс. Выяснить структуру вещества позволяют библиотеки масс-спектров, полученных электронным ударом. Наиболее часто используемые библиотеки содержат от 2000 до 500 000 масс-спектров, хотя количество известных в настоящее время соединений превышает 12 млн. Значительно сложнее интерпретировать масс-спектры, полученные при мягкой ионизации и десорбционной химической ионизации, потому что в этих случаях результаты масс-спектрометрии значительно зависят от экспериментальных условий.

### 6.1.3. Система газовый хроматограф — масс-спектрометр

**Соединение хроматографа с масс-спектрометром** представляет сложную проблему вследствие несовместимости их рабочих условий: хроматограф работает при атмосферном давлении или давлении выше атмосферного, а масс-спектрометр — в глубоком вакууме. Хромато-масс-спектрометрия в современном варианте заключается в непосредственном соединении этих двух методов.

Наибольшее значение для нормальной работы комбинированной системы газовый хроматограф — масс-спектрометр имеет скорость сканирования масс-спектров. Для получения представительного масс-спектра, а также информации о чистоте хроматографического пика необходимо регистрировать по крайней мере три спектра в процессе прохождения одного хроматографического пика. Если учесть, что время прохождения узких пиков в капиллярных колонках составляет считанные секунды, то скорость сканирования должна быть не менее 0,5–1,0 с/декада.

Хроматограф должен обеспечивать эффективное разделение, чтобы в масс-спектрометр вводились хорошо разделенные компоненты смесей. Это условие диктует выбор соответствующих колонок, например, для анализа очень сложных смесей нужны капиллярные колонки высокого разрешения. Кроме того, иногда необходимо предварительное фракционирование анализируемой смеси для ее упрощения или для отделения следовых компонентов от основных, мешающих их определению.

Неподвижная фаза должна быть термически устойчивой, т.е. испарение и разложение, при которых могут выделяться летучие продукты, должны быть сведены к минимуму. Это необходимо для получения стабильной базовой линии и малоинтенсивного фоновых масс-спектра, что особенно важно при анализе следовых компонентов. Кроме того, испарение или разложение неподвижной фазы приводит к загрязнению ионного источника и масс-анализатора, к потере чувствительности и разрешающей способности масс-спектрометра.

В системе ГХ-МС большое значение имеет природа газа-носителя. Во-первых, он должен легко отделяться от компонентов смеси, обеспечивая возможность их обогащения (либо за счет большей скорости откачки газа-носителя из ионного источника масс-спектрометра, либо с помощью специальных сепараторов). Во-вторых, ионы, образующиеся из газа-носителя, не должны мешать анализу компонентов смеси. Поэтому при ЭУ-ионизации в качестве газа-носителя обычно используют гелий, который откачивается быстрее, чем компоненты анализируемых смесей, и имеет высокий потенциал ионизации. При энергии электронов несколько ниже потенциала ионизации гелия молекулы анализируемых веществ ионизируются достаточно эффективно, а ионы гелия не создают помех при измерениях. В случае химической ионизации газ-носитель часто служит и газом-реагентом.

В настоящее время разработан целый ряд различных способов соединения ГХ и МС. Существует два основных типа интерфейсов: интерфейс с непосредственным соединением и молекулярный сепаратор.

Интерфейс — устройство, позволяющее ввести как можно больше элюата в масс-детектор или провести обогащение определяемого вещества.

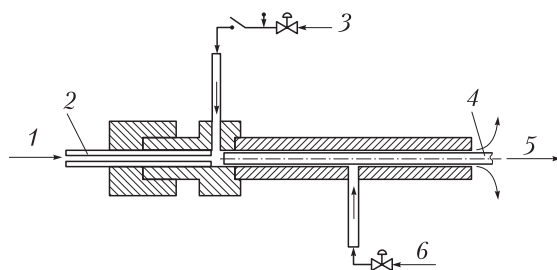
**Непосредственное соединение хроматографа и масс-спектрометра.** Системы непосредственного соединения могут использоваться в тех случаях, когда скорость потока через колонку сравнима со скоростью откачки ионного источника (например, капиллярные колонки с минимальным потоком газа-носителя).

Интерфейс выполняет две основные функции: понижение давления от атмосферного на выходе ГХ-колонки до  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  Па в ионном источнике масс-спектрометра и удаление избытка газа-

носителя. Если при работе прибора не надо проводить обогащение, то соединение хроматографа и масс-спектрометра можно осуществить с помощью *игольчатого вентиля* или *стеклянного капилляра*. Размеры капилляра выбирают в соответствии с желаемой величиной потока (например, в случае химической ионизации (ХИ) скорость потока газа-носителя  $\text{CH}_4$  может быть 15 мл/мин). Капилляр длиной 30–40 см и внутренним диаметром 0,012 см обеспечивает вязкостный поток желаемой величины. Для скорости потока 1–2 мл/мин внутренний диаметр капиллярного ограничителя должен быть около 0,006 см.

В качестве материала для капилляра часто используется платина, однако существенным недостатком такого интерфейса является активность платиновой поверхности, которая может зависеть и от условий хроматографического разделения, в частности от вида жидкой фазы на капиллярной колонке.

Широко используется *соединение с открытым разделительным устройством* (рис. 6.4). В соединениях такого типа постоянный поток элюата из капиллярной колонки вводится в масс-спектрометр. Входной линией и ограничителем обычно служит платиновый капилляр, соединенный с ионным источником отрезком тефлоновой трубки.



**Рис. 6.4.** Соединение для ГХ-МС с открытым делителем потока:

- 1 — поток из хроматографической колонки; 2 — остеклованная стальная трубка; 3 — подача газа (He) для регулирования величины потока в масс-спектрометр; 4 — капилляр; 5 — поток в масс-спектрометр; 6 — подача газа (He) для продувки

Преимуществом такого устройства по сравнению с непосредственным соединением является то, что конец ГХ-колонки находится при атмосферном давлении и поэтому соединение с масс-

спектрометром не влияет на ее рабочие параметры. Кроме того, при этом не нарушается высокая разделительная способность капиллярных колонок.

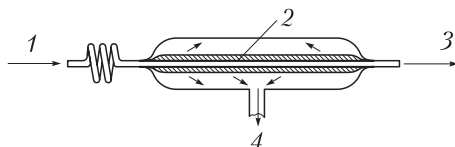
Основной недостаток соединения с открытым разделительным устройством — большая длина входной и ограничительной линий, что может приводить к потерям лабильных соединений, особенно в случае металлических капилляров. Это имеет большое значение и при анализе микропримесей, особенно если используются силилированные или ацетилированные производные.

**Применение обогатительных устройств.** Созданы обогатительные устройства, или сепараторы, в которых значительная часть газа-носителя удаляется и достигается концентрирование образца перед вводом в масс-спектрометр.

Известны разные типы **молекулярных сепараторов**: эффузионный сепаратор, струйный и мембранный.

В *эффузионном сепараторе* элюат из хроматографической колонки проходит через ограничитель давления в трубку со стенками из спекшейся стеклянной крошки со сверхтонкими порами (рис. 6.5), которая окружена вакуумной камерой, соединенной с форвакуумным насосом. Для большего обогащения используется двухступенчатый сепаратор. Обогащенный поток входит в масс-спектрометр через другой капиллярный ограничитель.

Недостатки эффузионных сепараторов: оптимизация наблюдается только в узком интервале скоростей потоков; возможность сорбции и разложения нестабильных веществ на пористой поверхности; более низкая эффективность, чем в других типах сепараторов. Несоблюдение оптимальных условий работы уменьшает эффективность сепаратора.



**Рис. 6.5.** Схема эффузионного одноступенчатого молекулярного сепаратора:

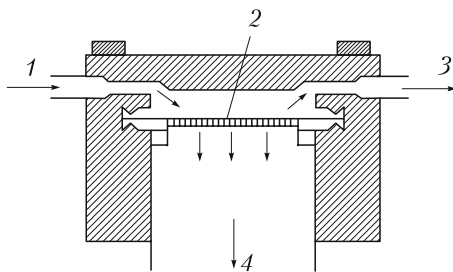
1 — поток из газового хроматографа; 2 — пористая стеклянная трубка;  
3 — поток в масс-спектрометр; 4 — откачка

Разработан ряд модификаций эффузионного сепаратора, свободных от указанных недостатков и имеющих более компактную конструкцию. В частности, в некоторых конструкциях стеклянная пористая трубка заменена керамической, серебряной или из нержавеющей стали. Поверхность металла силанизируют для придания ей инертных свойств.

Действие *струйного сепаратора* основано на различии скоростей диффузии разных газов в расширяющейся со сверхзвуковой скоростью газовой струе, что обеспечивает фракционирование газовой смеси. Элюат из колонки проходит через ограничитель и быстро расширяется в вакуумной камере. В свободно расширяющейся струе устанавливается градиент давления, направленный к середине струи. Скорость диффузии молекул в этой области зависит от их молекулярных масс и пропорциональна коэффициенту диффузии.

Струйные сепараторы обычно изготавливают из нержавеющей стали, однако для анализа термически нестабильных соединений используются стеклянные сепараторы. Преимущество стекла как материала для струйного сепаратора — его химическая инертность.

В *мембранном сепараторе* камера, в которую вводится поток из хроматографа, отделяется от вакуумной системы масс-спектрометра мембраной из силиконовой резины толщиной 0,025–0,040 мм (рис. 6.6). Газ-носитель и образец, проходящие над мембраной, диффундируют сквозь нее в масс-спектрометр. Проницаемость мембраны для органических веществ в 20–100 раз выше, чем для гелия и других неорганических газов. Обычно степень обогащения образца равна 10–20 %, а эффективность составляет 30–90 %. Мембранный сепаратор прост. Он может быть одно- или двухступенчатым.



**Рис. 6.6.** Схема мембранного молекулярного сепаратора:  
1 — поток из хроматографа; 2 — мембрана; 3 — откачка;  
4 — поток в масс-спектрометр



В одноступенчатом сепараторе давление на выходе обычно соответствует атмосферному, в двухступенчатом — давление на выходе первой ступени обычно равно атмосферному, на выходе второй ступени создается форвакуум.

Мембранные сепараторы весьма удобны для использования в ГХ-МС, поскольку давление в области мембраны равно атмосферному, времена удерживания не искажаются из-за несбалансированного потока, что иногда случается при использовании капиллярного ограничителя. Мембранный сепаратор может работать в большом интервале скоростей потока: при низких (8–10 мл/мин) и высоких (60–80 мл/мин) скоростях. Основная проблема при работе с мембранным сепаратором — оптимизация рабочей температуры: нижний предел рабочих температур 75–80 °С, верхний — 225–230 °С.

Идеального интерфейса, удовлетворяющего всем требованиям, пока не существует. Необходимо, чтобы он был наиболее подходящим для решения конкретной задачи. Выбор сепаратора определяется обычно его стоимостью, удобством конструкции, эффективностью удаления газа-носителя, гибкостью и рабочими характеристиками.

#### 6.1.4. Система жидкостный хроматограф — масс-спектрометр

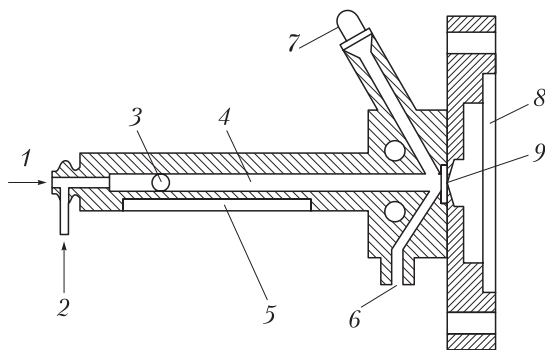
Непосредственное *соединение жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием* (ЖХ-МС) обеспечивает значительное сокращение времени анализа, позволяет осуществлять количественный анализ и селективное детектирование полученных ионов, однако при этом возникали определенные трудности. Одна из них — введение потока жидкости в вакуумируемый масс-спектрометр. Для решения этой проблемы было предложено несколько различных интерфейсов.

Для нормальной работы жидкостного хроматографа желательно, чтобы соединение его с масс-спектрометром не накладывало слишком сильных ограничений на виды растворителей, применяемых для элюирования, на величину потока растворителя, не препятствовало возможности градиентного элюирования и применения летучих и нелетучих буферов, а также реагентов в виде ионных пар.

Интерфейс должен обеспечивать высокую степень обогащения образца по отношению к растворителю, высокую эффективность переноса образца из колонки в ионный источник, отсутствие расширения хроматографических пиков, возможность испарения малолетучих образцов.

Рассмотрим основные конструкции интерфейсов для системы жидкостный хроматограф — масс-спектрометр.

*Источник ионизации при атмосферном давлении (ИАД)* — элюат из хроматографической колонки (рис. 6.7) поступает в нагреваемую испарительную трубку и в потоке подогретого газа-носителя (азот или гелий) переносится в ионную плазму. Ионизация происходит в коронном разряде при атмосферном давлении в результате ряда ионно-молекулярных реакций. Часть ионов из плазмы отбирается в квадрупольный масс-спектрометр через диафрагму.



**Рис. 6.7.** Схема ионного источника с ионизацией в коронном разряде при атмосферном давлении:

- 1 — поток из хроматографа; 2 — поток газа-носителя; 3 — фильтр;  
4 — испарительная стеклянная трубка; 5 — нагреватель; 6 — выход паров растворителя; 7 — электрод; 8 — фланец с вакуумным уплотнением; 9 — диафрагма для пропускания паров образца

При непосредственном соединении хроматографической колонки с ИАД предел обнаружения при анализе, например, дибензальцетона составляет около 1 нг.

Высокое давление газа в ионном источнике способствует образованию из молекул полярных растворителей кластерных ионов, которые включают пять и более молекул растворителя и сильно

затрудняют анализ низкомолекулярных полярных веществ. Этого недостатка лишен *интерфейс с распылительной каплеобразующей системой* ввода образца в ионный источник с ИАД и специальной камерой диссоциации кластерных ионов.

С помощью этой системы были получены масс-спектры нелетучих соединений: аминокислот, олигопептидов, антибиотиков, нуклеозидов, витаминов, гликозидов, алкалоидов — и показана возможность получения для них молекулярных или квазимолекулярных ионов. В качестве растворителей могут использоваться вода, метанол и ацетон.

*Интерфейс с непосредственным вводом жидкости (НВЖ)* — наиболее простой путь соединения жидкостного хроматографа и масс-спектрометра. К достоинствам этой системы относится возможность анализа элюатов, содержащих большое количество воды (до 70 %). Увеличение эффективности на 1–2 порядка может быть достигнуто при использовании химической ионизации, когда газ-носитель служит газом-реакгентом.

Изучение ряда растворителей, обычных для ВЭЖХ, показало, что они вполне приемлемы для использования в ЖХ-МС-химическая ионизация с интерфейсом НВЖ. В число этих растворителей входят *n*-пентан, изооктан, бензол, хлороформ, тетрагидрофуран, ацетонитрил, метанол, вода, буферные растворы.

В первых моделях интерфейсов НВЖ в качестве ограничителя потока использовали длинный узкий капилляр из стекла или металла с малым отверстием со стороны ионного источника; тонкую металлическую проволоку, введенную внутрь капилляра для уменьшения потока жидкости. Эффективность повышается, если капиллярную трубку заменить на диафрагму с регулируемой температурой.

В дальнейшем НВЖ-интерфейсы были усовершенствованы следующим образом. Образец в ионный источник вводится в виде струи, состоящей из отдельных капель жидкости. Распыление струи жидкости осуществляется при пропускании ее с большой скоростью через капилляр и отверстие в диафрагме, отстоящей на некотором расстоянии от конца капилляра. Испарение растворителя из капель струи происходит в специальной камере, откуда газовая смесь поступает в ионный источник (ХИ).

Такой интерфейс имеет следующие недостатки: чувствительность детектирования положительных ионов достаточно высока только для веществ с молекулярными массами более 150; он сочетается только с химической ионизацией; для анализа используется только 1–4 % элюата. Однако он просто устроен, позволяет работать с любыми летучими, а также с труднолетучими и термически нестабильными веществами и растворителями с высоким содержанием воды.

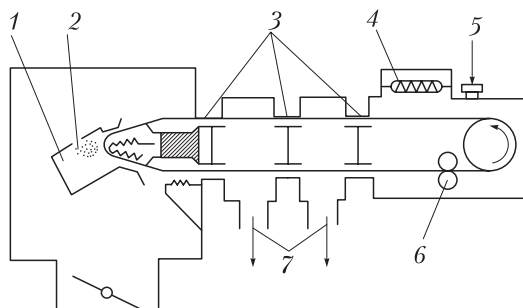
*Струйный интерфейс* предложен для обогащения элюата и удаления избытка растворителя перед вводом в ионный источник с тем, чтобы исправить один из самых серьезных недостатков НВЖ-интерфейсов — низкую эффективность использования образца. Он аналогичен применяемому в системе газовый хроматограф — масс-спектрометр.

В первом варианте этого устройства химическая ионизация пучка в области относительно высокого давления между соплом и расширителем осуществлялась с помощью электронной пушки с дифференциальной откачкой. Однако чувствительность при этом была низкой из-за неэффективного переноса ионов в анализатор. В более совершенном варианте источник ХИ соединен с распылителем обогреваемой трубкой. Все пары, проходящие через распылитель, поступают в ионный источник при давлении около 133 Па.

Струйный интерфейс чаще используют для определения неполярных и среднеполярных веществ.

*Интерфейсы с выпариванием растворителя*, основанные на преимущественном испарении более легкокипящего растворителя, обеспечивают более высокую степень обогащения элюата, который целиком поступает в масс-спектрометр.

Одним из основных типов интерфейсов, используемых в ВЭЖХ-МС, является *интерфейс с движущимся транспортером* (рис. 6.8). Элюат из ЖХ-колонки или после прохождения через предварительный детектор наносится на транспортер непосредственно или через делитель потока. Транспортер представляет собой ленту шириной около 0,3 см из металла (обычно нержавеющей сталь) или полиимидного полимера — каптона. Транспортер из нержавеющей стали имеет большую емкость, но каптон используется чаще, потому что обеспечивает испарение нестабильных соединений при более низкой температуре.



**Рис. 6.8.** Схема интерфейса с движущимся транспортом:  
1 — ионизационная камера; 2 — область электронного пучка; 3 — вакуумные уплотнения; 4 — ИК-испаритель; 5 — поток из хроматографической колонки; 6 — привод транспортера; 7 — откачка

Скорость потока растворителя, который может принять транспортер, зависит от вида растворителя и доходит до 1,5 мл/мин для летучих неполярных растворителей, а для воды или водных растворов до 0,1–0,2 мл/мин.

Интерфейс с ленточным транспортером вызывает минимальное изменение разрешения и формы хроматографических пиков. Так, если высота минимума между двумя соседними пиками, зарегистрированными УФ-детектором, равна 5–7 % от высоты пиков, то при использовании интерфейса с ленточным транспортером она увеличивается до 8–12 %. Применимость этого интерфейса для широкого круга термически нестабильных и нелетучих веществ показана на примерах анализа различных микотоксинов, триглицеридов, восков, порфиринов, антибиотиков, пестицидов, простагландинов, желчных кислот, нуклеозидов, нуклеотидов, дисахаридов.

Основным достоинством этой системы является возможность соединения ЖХ с методами ионизации, эффективными для нелетучих веществ, такими как полевая и лазерная десорбция, масс-спектрометрия вторичных ионов. Она может служить в этих случаях не только интерфейсом для ЖХ и МС, но и удобной системой ввода нелетучих образцов в масс-спектрометр.

Многие вещества, особенно биологического происхождения, могут вызывать загрязнение ионного источника, что влияет на результаты анализа образцов. Вместе с тем частая очистка источника отрицательно сказывается на производительности прибора. Для

предотвращения попадания в ионный источник нежелательных веществ была разработана *методика переключения потоков* для системы ЖХ-МС с НВЖ-интерфейсом.

Элюат из ЖХ-колонки попадает в отдельный хроматографический детектор, а в масс-спектрометр с химической ионизацией непрерывно подается чистый растворитель до начала выхода из колонки определяемого вещества, которое должно быть проанализировано масс-спектрометром. Тогда потоки переключаются, и в ионный источник подается элюат из хроматографа. После регистрации пика потоки вновь переключаются так, что количество веществ, поступающих в масс-спектрометр, значительно уменьшается.

## 6.2. Методы хромато-масс-спектрометрии

К основным методам хромато-масс-спектрометрии относятся: ионная масс-хроматография, хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения, получение производных анализируемых веществ, идентификация соединений в смесях и количественный анализ.

### 6.2.1. Ионная масс-хроматография

**Ионная масс-хроматография (ИМХ)** представляет собой метод, в котором масс-спектрометр используется для непрерывного селективного детектирования одного или нескольких ионов с заданными массами. Селективное ионное детектирование позволяет определить время удерживания каждого компонента, идентифицировать его и провести количественный анализ.

Ионная масс-хроматография осуществляется двумя способами.

Способ *селективного ионного детектирования (СИД)* состоит в том, что из всех ионов, образующихся в ионном источнике, на детектор поступают только ионы с одной или несколькими заданными массами. *Многоионное детектирование (МИД)* — это способ одновременной регистрации нескольких ионов.

В научной литературе встречаются и другие названия метода ИМХ: масс-фрагментография, мониторингирование выбранных ионов, получение ионных профилей.

Благодаря высокой специфичности способ СИД незаменим при анализе примесей, поскольку удастся выделять их пики даже на фоне больших соседних хроматографических пиков. Этот способ является наиболее чувствительным и селективным в ХМС. Однако он применим только тогда, когда заранее известны характеристические пики анализируемых соединений.

### 6.2.2. Хромато-масс-спектрометрия высокого разрешения

Сочетание масс-спектрометрии высокого разрешения (МСВР) с хроматографическим разделением является перспективным и позволяет получать информацию двоякого рода. Во-первых, это полные масс-спектры высокого разрешения за время выхода хроматографических пиков, причем точное измерение масс ионов позволяет установить элементный состав каждого иона в масс-спектре. Во-вторых, использование масс-спектрометра высокого разрешения как хроматографического детектора с очень высокой специфичностью для непрерывного детектирования заданных ионов с точной массой позволяет отделить их от ионов с такой же номинальной массой, но с другим элементным составом. Это увеличивает селективность детектирования по отношению к другим веществам, элюируемым вместе с данным компонентом, по отношению к фону прибора и т.п.

Масс-хроматограммы, получаемые для ионов с точными массами, более просты, чем хроматограммы ионов с номинальными массами. Они содержат меньше пиков, которые поэтому лучше разрешены, и позволяют более точно определять времена удерживания компонентов. Для регистрации таких масс-хроматограмм задается точная масса прослеживаемого иона и окно масс, определяемое точностью измерения массы. При каждом сканировании масс-спектра интенсивность пика иона, попадающего в окно масс, регистрируется как функция номера соответствующего масс-спектра, образуя масс-хроматограмму высокого разрешения.

### 6.2.3. Получение производных анализируемых веществ

При подготовке образца к анализу для повышения летучести и стабильности анализируемых веществ **получают производные анализируемых веществ**. Анализ производных обычно требует меньше времени и при этом улучшается хроматографическое разрешение.

Введение новых структурных групп в молекулы анализируемых веществ может изменить их масс-спектральные характеристики (интенсивность пиков молекулярных и характеристических осколочных ионов, направление и селективность распада, вероятность захвата электронов или сродство к протону и др.), вследствие чего повышается специфичность и чувствительность анализа.

Однако получение производных — это дополнительная операция, усложняющая общую схему анализа. Для ХМС очень важен также правильный выбор производных и методов их получения, так как степень превращения разных компонентов может быть различной. В оптимальном случае реакция, используемая для получения производных, должна быть достаточно простой и селективной. Получаемые производные должны обладать меньшей адсорбционной способностью и большей термостабильностью по сравнению с исходными веществами, быть стабильными в растворителях и устойчивыми к гидролизу.

При получении производных в качестве реагентов используется большая группа соединений. Основные типы реакций связаны с получением ацильных, алкильных и силильных производных, производных первичных аминов, карбонильных соединений, бифункциональных соединений и др. *Силилирование* — это наиболее эффективный метод получения производных для ГХ-МС. Широкое распространение получили триметилсилильные (ТМС) производные. Введение ТМС-групп значительно повышает летучесть исследуемых соединений.

Одним из первых силилирующих реагентов был гексаметилдисулазан, затем его заменили бис(триметилсилил)ацетамидом и бис(триметилсилил)трифторацетамидом, которые являются очень хорошими растворителями. Реакции с этими реагентами, протекающие, как правило, количественно, очень часто применяются для получения ТМС-производных сложных смесей органических соединений, выделяемых из биологических объектов.

Одно из достоинств силилпроизводных — простота проведения реакции.

Функциональные группы органических соединений можно расположить в следующий ряд по уменьшению «силильной акцепторной способности»:

спирты > фенолы > карбоновые кислоты > амины > амиды.



*Алкилпроизводные* образуются при взаимодействии органических соединений, содержащих активный атом водорода, с соединениями, легко отщепляющими алкильную группу, в присутствии основного катализатора. В качестве метилирующего агента обычно используется диазометан, реакция с которым осуществляется с количественным выходом в мягких условиях, без нежелательного повышения температуры. Кроме того, избыток реагента легко удаляется. С помощью этого реагента получают метильные производные кислот и некоторых спиртов. Легче всего образуются эфиры кислот. При метилировании соединений, содержащих несколько функциональных групп, возможно образование набора производных. Широкое распространение при анализе углеводов, пептидов, пуринов и пиримидинов получил процесс перметилирования.

Получение стабильных производных оксимов связано с блокированием кетогруппы для предотвращения ее енолизации в последующих реакциях. Получение производных осуществляется растворением кетона в подходящем растворителе и добавлением соответствующего реагента.

Амины, играющие важную роль в структурных и биохимических исследованиях, анализируют в виде ацетил-, триметилсилил-, трифторацетил-, пентафторпропионил- и гептафторбутирильных производных. Первичные амины часто анализируют в виде изотиоцианатных производных.

Предложен *метод получения производных первичных и вторичных аминов* при взаимодействии их с этиловыми эфирами дитиокарбаминовой кислоты. Образующиеся производные первичных аминов разлагаются при пиролизе в инжекторе хроматографа (в то время как более устойчивые производные вторичных аминов остаются без изменения) и анализируются на ГХ-колонке высокого разрешения, соединенной с масс-спектрометром.

Большую роль в получении производных для ХМС играет *метод смешанного блокирования* различных функциональных групп разными остатками. В этом случае правильный подбор возможных блокирующих групп часто позволяет увеличить стабильность производных и повысить специфичность распада при диссоциативной ионизации. Так, при изучении биологически активных катехоламинов предложены следующие реакции получения производных:

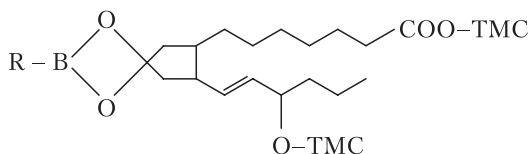
перфторацилирование, триметилсилилирование, N-трифторацетил-О-триметилсилилирование.

Масс-спектры химической ионизации *боратных производных* характеризуются наличием интенсивных пиков молекулярных или квазимолекулярных ионов. Атом бора оказывает определяющее влияние на направления распада, так что наиболее интенсивные пики в масс-спектрах относятся к исходной молекуле, а не к блокирующей группе. Наличие двух природных изотопов бора облегчает идентификацию даже при низком разрешении.

Производные диолов и кетонов имеют хорошие хроматографические характеристики, что может быть использовано при анализе алкенов, которые селективно окисляются. Последующее превращение их в фенилборатные производные и анализ с помощью ГХ-МС с электроударной или химической ионизацией позволяют установить положение двойной связи в исходных алкенах.

Боратные производные широко используются для стабилизации углеводов. Особо следует сказать о смешанных борат-ТМС-производных. Они дают весьма характерные масс-спектры, на основании которых удается определять число атомов углерода (пентоза или гексоза), размер кольца (фураноза или пираноза) и стереохимию гидроксильных групп.

Для анализа таких многофункциональных соединений, как простагландины, получают *тризамещенные производные*, содержащие, например, циклическую боратную, ТМС-эфирную и ТМС-сложноэфирную группы:



Борные кислоты используют для получения хорошо разделяющихся полизамещенных производных простагландинов  $F_{1a}$ ,  $F_{2a}$  и  $F_{3a}$ . Метод ХИ позволяет определять простагландины  $F_a$  по ионам  $(M-RBO_2H_2-TMC-O)^+$ , которые для разных простагландинов имеют разные массы. ЭУ-масс-спектры производных простагландинов  $F_{2a}$  характеризуются максимальным пиком иона

(M-71)<sup>+</sup>, имеющим такую же массу, как соответствующий ион (M-69)<sup>+</sup> в спектре  $F_{3a}$ .

Циклические боратные производные получают также для анализа липидов, гидроксиламинов, гидроксикислот, катехоламинов.

#### 6.2.4. Идентификация соединений в смесях

Важнейшей целью ХМС-анализа являются идентификация и качественный анализ соединений и смесей. Этот метод позволяет охарактеризовать вещество, не выделяя его из смеси, часто весьма сложной.

Для **качественного анализа** и установления структуры соединений ХМС дает полные масс-спектры компонентов, являющиеся как бы «отпечатками пальцев» молекулярной структуры и характеризующие массы молекул и основных структурных фрагментов, по которым можно установить их состав и наличие определенных функциональных групп. Масс-спектры высокого разрешения позволяют с большой точностью установить элементный состав молекулярного и осколочных ионов, а значит, и структуру исходной молекулы.

По масс-хроматограммам определяют времена удерживания (или индексы удерживания) всех разделенных компонентов, причем благодаря селективному ионному детектированию и специальным методам обработки данных степень разделения на масс-хроматограммах, как правило, значительно выше, чем на обычных хроматограммах, регистрируемых другими детекторами. Селективный характер детектирования с помощью масс-спектрометра позволяет выделить определенные классы веществ по сложной хроматограмме.

Разные методы ионизации обладают селективностью по отношению к некоторым структурным или функциональным особенностям анализируемых молекул. Выбрав соответствующий способ ионизации, можно осуществить селективный анализ определенных типов структур или удостовериться в наличии определенных функциональных групп.

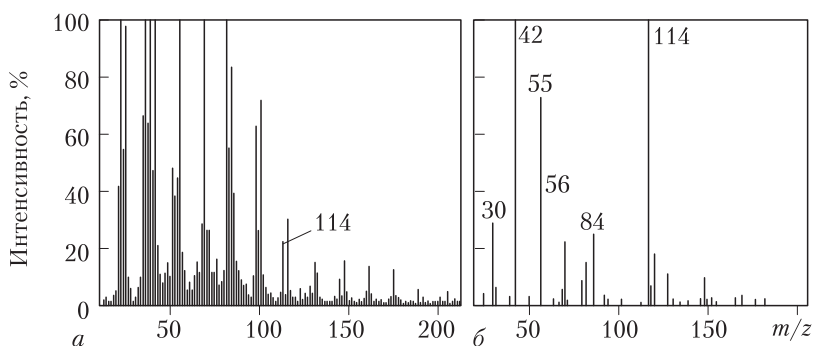
**Идентификация соединений** по масс-спектрам осуществляется сравнением полного масс-спектра анализируемого вещества или отдельных пиков в нем с масс-спектрами эталонных соединений либо интерпретацией анализируемого масс-спектра на основании спектро-структурных корреляций. Пики ионов для анализа

измеряются путем регистрации полных масс-спектров компонентов хроматограммы либо непрерывной регистрацией небольшого набора пиков методом селективного ионного детектирования.

В сложных случаях, когда имеет место наложение пиков характеристических ионов данного компонента и пиков других компонентов смеси, для уменьшения наложения пиков используют масс-спектрометр с высокой разрешающей способностью. В этом случае могут быть разделены ионы, имеющие одинаковые номинальные массы, но разные элементные составы. Затруднения в идентификации возникают и тогда, когда массы ионов анализируемых соединений не являются характеристичными (это наблюдается при определении нитрозаминов в табачном дыме или пищевых продуктах). При анализе табачного дыма с помощью системы ГХ-МС масс-спектрограммы строились по характеристическим ионам нитрозопиперидина ( $m/z$  30, 42, 55, 56, 114). Ни один из этих ионов не был специфическим; например, пик иона с массой 30 накладывается на пик изотопного иона с массой 29.

Согласно данным по времени удерживания нитрозопиперидина, максимумы на масс-хроматограммах для всех пяти ионов соответствуют этому соединению, подтверждая присутствие нитрозопиперидина в смеси. Однако вывод, полученный на основании только этой информации, весьма ненадежный. Для оценки надежности полученной информации необходимо рассмотреть полный масс-спектр этого соединения. Он содержит большое число пиков, на фоне которых теряются пики молекулярного и характеристических осколочных ионов нитрозопиперидина. Операция вычитания фона позволяет получить более четкий масс-спектр (рис. 6.9), который хорошо совпадает с масс-спектром эталонного нитрозопиперидина.

При неполном разделении компонентов, когда каждый хроматографический пик соответствует нескольким соединениям, анализ масс-спектров компонентов позволяет идентифицировать их. Так, ГХ-МС-химическая ионизация была использована для детальной характеристики триглицеридов (ТГ) с числом атомов углерода до 62 в образцах арахисового, рапсового и горчичного масел. Хроматограммы ТГ, выделенных из указанных масел, имеют широкие пики сложной формы, каждый из которых соответствует ТГ с числом атомов углерода.



**Рис. 6.9.** Масс-спектры нитрозопиперидина, содержащегося в экстракте сигаретного дыма до (а) и после (б) вычитания фона

Более детальную информацию о структуре ТГ получили с помощью ионной масс-хроматографии. Для этого осуществили циклическую непрерывную регистрацию масс-спектров, затем из них реконструировали ионные масс-хроматограммы для любого иона. Масс-хроматограммы по пикам квазимолекулярных ТГ-ионов с 48, 50, 52 и 54 атомами углерода в молекуле, выделенных из молочного жира, были зарегистрированы в виде четырех пиков. Каждый из них соответствовал группе ТГ с одинаковым числом атомов углерода в молекуле. Ионные масс-хроматограммы показывают, что времена удерживания в некоторой степени зависят от числа двойных связей.

Важной задачей ХМС является определение отдельных изомеров. Так, канцерогенная активность полициклических ароматических углеводородов сильно зависит от структуры молекул. Из пяти структурных изомеров тетрациклических ароматических систем с молекулярной массой 228 бенз[а]антрацен является сильным канцерогеном, хризен и бенз[с]фенантрен обладают слабой канцерогенностью, а два других соединения не обнаруживают свойств канцерогенов. Анализ этих изомеров затруднен из-за близости их хроматографических и масс-спектральных характеристик. Естественно, подбор оптимальных условий анализа с варьированием (например, методов ионизации и условий разделения) значительно повышает вероятность разделения изомеров. Немаловажную роль играет правильный выбор производных анализируемых компонентов со специфическими направлениями диссоциа-

тивной ионизации. Так, при ХИ со смесью газов-реагентов (5–10 %  $\text{CH}_4$  в аргоне) изомеры полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) давали различные масс-спектры. Специфичность ХИ была использована для идентификации изомеров ПАУ, обнаруженных в воздухе. Метод позволил достаточно хорошо разделить метилантрацены и метилфенантроны, а также метилфлуорантены, метилпирены и бензфлуорены.

Сравнение результатов анализа трифторацетил- и пропилхлорид-производных амфетамина, проведенного с помощью ГХ-МС на колонках с хиральной и ахиральной неподвижными фазами, показало, что обе неподвижные фазы могут быть использованы для определения энантиомеров. Однако преимуществом хиральной фазы является возможность разделения всех изомеров, а при разделении на ахиральных фазах необходима коррекция результатов на совместное элюирование энантиомеров.

Использование разных методов ионизации дает дополнительную возможность для получения информации о структуре. Чаще всего в ХМС применяется химическая ионизация. В этом случае процессы ионизации совершенно отличны от ЭУ-ионизации и происходят в результате химических реакций между первичными ионами (ионами-реагентами) и молекулами исходного образца.

Предложены ионно-молекулярные реакции для идентификации разных органических функциональных групп: первичных, вторичных и третичных спиртов; первичных, вторичных и третичных аминов, циклических алканов и олефинов; ароматических соединений, содержащих и не содержащих серу; в некоторых случаях удается различать окисленное состояние гетероатомов в полиароматических соединениях и даже стереоизомеры.

При химической ионизации оксидом дейтерия  $\text{D}_2\text{O}$  все активные атомы водорода, связанные с атомами азота, серы и кислорода в органических молекулах, в ионном источнике масс-спектрометра обмениваются на дейтерий. Если молекулярная масса образца известна, то число активных атомов водорода может быть рассчитано по пикам масс-спектра в области этих молекулярных масс. Таким образом можно идентифицировать первичные, вторичные и третичные амины.

Масс-спектры ХИ могут быть использованы также для идентификации многих других функциональных групп. Так, спектры кис-

лот, альдегидов и кетонов содержат соответствующие характерные пики ионов.

Масс-спектры отрицательных ионов дополняют информацию масс-спектров положительных ионов, так как структурные характеристики, обуславливающие стабилизацию этих ионов, различны.

При использовании в качестве газа-реагента аргона или азота масс-спектры ХИ положительных ионов очень похожи на ЭУ-спектры. С помощью импульсной техники можно одновременно регистрировать спектры положительных ионов, похожие на ЭУ-спектры, и спектры отрицательных ионов, образующихся в результате резонансного электронного захвата. Это позволяет получать взаимно дополняющую информацию о структуре.

#### 6.2.5. Количественный анализ

Количественный анализ ионов требует предварительной идентификации компонентов анализируемой смеси и выбора характеристических ионов. В оптимальном случае для анализа смеси необходимо выбирать ионы, которые образуются только за счет диссоциативной ионизации анализируемых соединений. Если пики характеристических ионов не являются чистыми (т.е. имеются наложения), то добиться надежного количественного определения не удастся. Вклад фона или пиков ионов других компонентов в интенсивность пиков характеристических ионов приводит к завышенным результатам при определении концентрации анализируемого вещества. При этом необходимо учитывать, что наложение пиков может быть существенным, если оно обусловлено компонентами, присутствующими в смеси в больших количествах.

Селективность зависит от выбора характеристических ионов. Считается, что ионы с большими массами более характеристичны, чем ионы с малыми массами, которые имеют много источников образования. Наиболее характеристичными являются ионы, представляющие целую молекулу. Получить такие ионы можно при ионизации электронами низких энергий или методами «мягкой» ионизации, например химической. ХИ имеет дополнительное преимущество — возможность выбора газа-реагента для селективной ионизации определенных компонентов сложной смеси. Таким образом, вместо одинаковой общей ионизации всех летучих молекул

смеси, как при ЭУ, могут быть подобраны условия для ионизации только определенных типов соединений.

Современные масс-спектрометры обеспечивают сканирование полного масс-спектра для количества вещества порядка  $10^{-10}$  г; в режиме СИД увеличивается время измерения соответствующих пиков и, следовательно, в 100–1000 раз понижается теоретический предел обнаружения. Благодаря этому данный метод наиболее удобен для количественного определения отдельных компонентов или ограниченного числа компонентов смесей.

Количественный анализ в ХМС обычно проводят с использованием внутреннего стандарта (одного или нескольких). Измеряется отношение площадей профилей пиков ионов на масс-хроматограммах анализируемого соединения и стандарта; иногда при расчетах используют не отношение площадей, а отношение интенсивностей пиков. Путем анализа искусственных смесей получают зависимость этого отношения от концентрации анализируемого соединения.

При количественном анализе соединений используют три типа внутренних стандартов: аналоги, меченные стабильными изотопами; гомологи, характеризующиеся ионами того же состава, что и анализируемые соединения, но с другим временем удерживания; соединения, которые распадаются с образованием иных ионов, но обладающие сходными хроматографическими характеристиками.

Основное преимущество меченых соединений — сходство с анализируемыми соединениями. Они дают ионы того же состава, но с другой массой, что обеспечивает наибольшую чувствительность их регистрации.

Применение в качестве внутреннего стандарта гомолога, образующего такой же ион, как и анализируемое вещество, но с другим временем удерживания, имеет то преимущество, что может быть реализовано на любом масс-спектрометре.

Синтезируемые меченые соединения, используемые в качестве внутренних стандартов, не всегда имеют высокую изотопную чистоту, что может приводить к ошибкам при количественном анализе. Эти ошибки возникают по двум причинам: наложение пиков образца на пики характеристических ионов стандарта; наложение пиков стандарта на пики характеристических ионов анализируемых соединений.



## 6.3. Применение хромато-масс-спектрометрии

Сочетание хроматографии и масс-спектрометрии позволяет идентифицировать органические вещества по их масс-спектрам. Этот метод позволяет определять лекарственные вещества и их метаболиты в биологических жидкостях, определять биологически активные вещества в клетках и тканях организма, анализировать пробы сложного состава (продукты питания, природные и сточные воды).

### 6.3.1. Лекарственные вещества и их метаболиты

Хромато-масс-спектрометрия широко применяется для изучения лекарственных веществ (ЛВ) и их биотрансформации в организмах. При исследовании ЛВ и их метаболитов ХМС позволяет проводить идентификацию неизвестных соединений, присутствующих в малых концентрациях в сложных биологических объектах, и количественное определение идентифицированных соединений.

В фармакологических исследованиях используются главным образом два типа внутренних стандартов: аналоги, меченные стабильными изотопами, и структурные аналоги.

Меченые соединения в качестве внутренних стандартов применяли при исследовании пропrenoла, беклофена, норэтилдрона, амитриптилина и его основных метаболитов, берберина и др.

Структурные аналоги в качестве внутреннего стандарта в ХМС-методе использовали при определении лидокаина и его дезэтилированных метаболитов, амфетамина, лоразепама и оксазепама, карбамазепина, имипрамина, никотина, виразола, галоперидола, преднизолона и др.

Метод ХМС широко применяется для идентификации примесей лекарственных веществ. Известно, что многие лекарственные вещества содержат довольно значительные количества примесей, которые могут быть ошибочно приняты за метаболиты. Примеси могут появиться как при синтезе ЛВ, так и в результате разложения во время хранения. Например, при исследовании образцов кокаина, применяемого в медицине и продаваемого в США на чер-

ном рынке, обнаружено, что второй содержит значительное количество примеси другого вещества. По масс-спектру оно было идентифицировано как лигнокаин; хроматографический количественный анализ показал, что в продаваемом кокаине содержится до 37 % лигнокаина.

Методы ГХ и ЖХ оказались недостаточно чувствительными для определения метимазола (1-метилимидазол-2-тиол) в моче крыс и плазме крови. Однако метод, включающий экстракцию, бензилирование метимазола и последующий анализ ГХ-МС с ЭУ-ионизацией, позволил значительно повысить чувствительность определения.

Метод ГХ-МС оказался достаточно селективным и чувствительным для выявления антидепрессанта имипрамина и его метаболитов в различных биологических жидкостях.

Основным фактором, ограничивающим чувствительность определения, являются мешающие эндогенные соединения, обладающие сходными экстрактивными и аналитическими характеристиками, вследствие чего пределы обнаружения лекарственного вещества в плазме крови на несколько порядков выше предела обнаружения индивидуального соединения.

При исследовании метаболизма хлорпромазина в организме человека методом ХМС были идентифицированы (по временам удерживания и относительной интенсивности пиков) два метаболита: десметил- и дидесметилхлорпромазин. Селективность определения удалось увеличить при переходе к регистрации ионов, характеризующих трифторацетильные боковые цепи этих метаболитов (массы 168 и 154), а также молекулярных ионов, содержащих изотоп  $^{37}\text{Cl}$ .

Для определения карбамазепина использовали метод ВЭЖХ с обращенной фазой для выделения и разделения метаболитов карбамазепина из мочи крыс с последующим ГХ- и ГХ-МС-анализом. Было идентифицировано два метаболита карбамазепина: его *цис*-10,11-дигидродиол- и *о*-метилкатехин-производные.

Единственным серьезным недостатком ГХ-МС-метода при определении ЛВ и их метаболитов является невозможность анализа труднолетучих соединений. Один из возможных путей его преодоления — введение в аналитическую схему пиролитической установки.

### 6.3.2. Клиническая биохимия

Хромато-масс-спектрометрия позволяет получать ценную информацию при определении биологически активных веществ, участвующих в химических реакциях живых организмов. Известно, что многие заболевания вызваны в определенной степени отклонением от нормального протекания некоторых химических реакций в клетках и тканях организма. Для диагностики заболеваний необходимо установить связь между известными заболеваниями и изменениями биохимического состава клеток и биологических жидкостей.

Основным методом детального анализа характерных многокомпонентных смесей физиологических жидкостей стал метод ХМС, который применим для определения различных классов биологически важных соединений. При этом для его осуществления требуются небольшие количества (микролитры) биологической жидкости.

Метод ГХ-МС сыграл важную роль в исследовании метаболизма желчных кислот в организме человека. Его использовали для установления различных стадий болезни, связанных со специфическими нарушениями путей биосинтеза желчных кислот и их метаболизма.

При изучении стимулирования метаболизма арахидоновой кислоты в коже человека под воздействием УФ-облучения использовали метод ХМС с изотопным разбавлением для количественного определения арахидоновой кислоты и ее метаболитов в коже (в норме и после облучения). Установили, что содержание арахидоновой кислоты и ее метаболитов после облучения повышалось.

Важную роль в организме играют органические кислоты, для определения которых в биологических жидкостях применяют метод ХМС. Основным этапом пробоподготовки при определении органических кислот является получение их производных при взаимодействии с донорами метил- и алкилсилильных групп, диазотметаном и другими метилирующими агентами.

Метод ХМС использовали также для количественного определения в сыворотке крови человека эндогенных индолы: триптофана, N-ацетилтриптофана и др.

С помощью ХМС-метода определены катехин и его метаболиты в моче. Использование меченых соединений при анализе катехоламинов потребовало разработки методов синтеза дейтерированных катехоламинов и их метаболитов.

Метод анализа катехоламинов с применением ИМХ-МСВР использовали для одновременного определения адреналина и норадреналина в плазме крови. Исследуемые катехоламины выделяли адсорбцией на оксиде алюминия и превращали в соответствующие N-трифторацетил-O-триметилсилилпроизводные.

Для анализа аминокислот в биологических жидкостях применяют метод ГХ-МС с предварительным выделением аминокислот методом ионообменной хроматографии. Во время такой пробоподготовки меченые молекулы кислот теряют изотопную метку при пребывании в водных растворах с низким значением pH. Получение ТМС-производных аминокислот и их экстракция петролевым эфиром позволяют перевести аминокислоты в форму, удобную для ГХ-МС-анализа.

Для обнаружения алкилирующих агентов, многие из которых являются канцерогенными, применяют метод ГХ-МС, например обнаружение и количественное определение производных S-алкилцистеина и N-алкилгистидина в гемоглобине при использовании дейтерированного соединения в качестве внутреннего стандарта. При ЭУ-ионизации масс-спектры производных S-метилцистеина оказались нехарактеристичными, поэтому для анализа применили химическую ионизацию с изобутаном в качестве газа-реагента.

### 6.3.3. Определение токсикантов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды

Метод ХМС позволяет проводить идентификацию и количественное определение содержания токсичных компонентов в пищевых продуктах. Наибольшую ценность этот метод представляет при идентификации и количественном определении N-нитрозаминов в рыбных и мясных продуктах.

Необходимость идентификации N-нитрозоаминов и измерения их концентраций в пищевых продуктах диктуется двумя факторами. Во-первых, из всех изученных нитрозаминов только N-нитро-

замины обладают канцерогенной активностью по отношению к живым существам. Во-вторых, N-нитрозамины образуются при взаимодействии соответствующих вторичных аминов и нитрит-ионов. В настоящее время установлено, что N-нитрозосоединения образуются также, хотя и с меньшей легкостью, из первичных и третичных аминов и даже из четвертичных аммониевых солей. При определении N-нитрозодиметиламина в рыбе методом ХМС достигнутый предел обнаружения составил 10 нг на 1 мкл введенного материала. Методика была распространена и на определение гетероциклических N-нитрозаминов и N-нитрозодиакиламинов в мясных продуктах.

Для определения N-нитрозо-3-гидроксипирролидина (НГП), который образуется в пищевых продуктах при их термической обработке, применяется ГХ-МСВР-метод.

Методы ХМС занимают ведущее место среди аналитических методов для изучения окружающей среды. Актуальным является определение таких соединений, как хлорсодержащие углеводороды и их метаболиты, полихлорбифенилы, гексахлорциклогексан, гексахлорбензол, хлорированные дибензодиоксины и дибензофураны, пластификаторы, добавки к медицинским и пищевым препаратам и металлоорганические соединения.

Эффективное концентрирование органических компонентов атмосферных загрязнений было достигнуто с помощью сорбента «Тенакс GC». Этот сорбент гидрофобен, так что концентрирование водяных паров минимальное. Патроны с сорбентом после отбора образцов могут храниться при температуре 0 °C в течение 4 недель без значительных изменений. Сорбированные соединения вводят в хроматографическую колонку путем термической десорбции.

Для определения альдегидов в образцах воздуха после их улавливания в присутствии углеводородов получают *o*-бензоил-оксипроизводные, которые и анализируют методом ГХ-МС-химическая ионизация (газ-реагент аммиак).

Большое внимание уделяется определению в различных объектах полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), обладающих канцерогенной активностью. Идентификация осуществляется по пикам молекулярных ионов, которые в спектрах ПАУ очень интенсивны.

ХМС-методы имеют большое значение при определении природных и синтетических органических соединений в воде, особенно питьевой. Методы количественного определения этих соединений основаны, как правило, на многоионном детектировании и получении масс-хроматограмм по полному ионному току и отдельным пикам, а также на использовании внутренних стандартов. С помощью ХМС достигается предел обнаружения углеводов в образцах воды 1 нг/л (для каждого соединения).

Для определения органических примесей в питьевой воде успешно используется также метод ЖХ-МС, в частности при количественном анализе пестицида ротенона, применяемого для контроля размножения рыб. Метод ЖХ-МС обеспечивает быстрое селективное и количественное определение ротенона.

Одним из компонентов загрязнений окружающей среды являются алкилбензолсульфонаты, входящие в состав синтетических моющих средств. Для установления присутствия линейных алкилбензолсульфонатов в образцах природных вод успешно применяется ГХ-МС-метод.

С использованием метода ХМС получена полезная информация о структуре продуктов метаболизма пестицидов различной химической природы.

# ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

## 7.1. Общая характеристика

Электрофорез относится к электрохимическим методам разделения. Этот метод основан на способности заряженных частиц перемещаться под действием постоянного электрического тока к противоположно заряженным электродам. Скорость движения заряженных частиц

$$u = zV / 6\pi r\eta, \quad (7.1)$$

где  $u$  — скорость движения частицы;  $z$ ,  $r$  — заряд и радиус частицы;  $V$  — напряженность электрического поля;  $\eta$  — вязкость среды.

Скорость движения частиц не может служить характеристикой данного вида частиц, так как зависит от напряженности электрического поля. Поэтому введено понятие электрофоретической подвижности  $u_0$ :

$$u_0 = u / V = z / 6\pi r\eta. \quad (7.2)$$

**Электрофоретическая подвижность** — это скорость перемещения вещества под влиянием градиента потенциала. Измеряется в квадратных сантиметрах на вольт-секунду ( $\text{см}^2/\text{В} \cdot \text{с}$ ).

**Электрофорез** — это метод разделения смеси веществ, основанный на различии в электрофоретической подвижности их ионов в растворе электролита, помещенного в электрическое поле.

Значимый результат измерения величины  $u_0$  получается только в том случае, когда экспериментальные условия точно определены. Электрофоретическая подвижность зависит от природы вещества и проводящей жидкости, концентрации, pH и присутствия дополнительных растворителей. Она обратно пропорциональна вязкости среды. С повышением температуры вязкость среды уменьшается, поэтому  $u_0$  увеличивается. Значительное влияние на подвижность частиц оказывают ионная сила раствора: с повышением ионной силы подвижность частиц уменьшается.

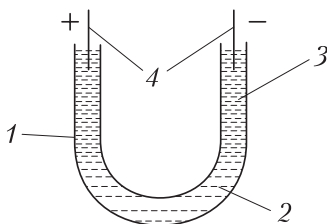
Электрофоретическую подвижность можно измерить непосредственно или сравнивая с подвижностью стандартного образца.

## 7.2. Методы электрофореза

Электрофоретическое разделение компонентов смеси происходит в жидкой среде. Этот метод по оформлению похож на плоскостные хроматографические методы, а также на метод колоночной жидкостной хроматографии.

При электрофорезе неподвижная фаза – это растворитель (буферный раствор), а растворенное вещество мигрирует под действием электрического тока. Буферный раствор поддерживает постоянное значение pH и обеспечивает транспортный поток.

**Метод простого электрофореза** основан на миграции ионов в буферном растворе. Предложен А. Тизелиусом (Нобелевская премия, 1948). При работе по методу простого электрофореза в U-образную трубку (рис. 7.1) помещают анализируемый и буферный раствор, который имеет меньшую плотность и находится сверху.



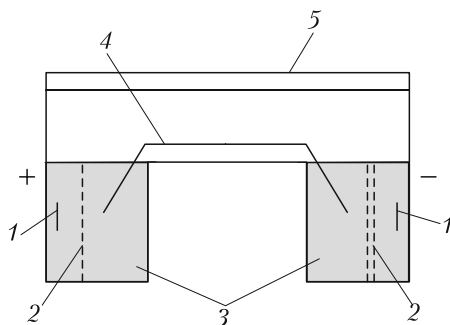
**Рис. 7.1.** Схема устройства для простого электрофореза:

1 – U-образная трубка; 2 – раствор пробы; 3 – буферный раствор;  
4 – электроды

**Электрофорез на границе раздела фаз**, или **фронтальный электрофорез**, применяется главным образом для анализа смесей белков и дает представление об истинной подвижности мигрирующих частиц. В этом методе разделяемые ионы разной химической природы при наложении постоянного электрического тока концентрируются вблизи поверхности раздела растворов.

Более полное разделение ионов происходит в **методе электрофореза на носителе** (рис. 7.2).





**Рис. 7.2.** Схема устройства для электрофореза на носителе:  
1 — электроды; 2 — диафрагмы; 3 — буферные растворы; 4 — фильтровальная бумага; 5 — крышка

**Метод зонного электрофореза** — один из вариантов метода электрофореза на носителе. Слой носителя (бумага, гель) пропитывают раствором инертного электролита. Исследуемый раствор в виде узкой полоски наносят вблизи одного из концов слоя носителя. Два конца носителя помещают в буферные растворы, в которые погружены электроды. При электролизе образуются зоны, соответствующие различным ионам исследуемого раствора.

Скорость миграции ионов зависит от многих факторов: заряд и размер ионов, напряженность поля, вязкость среды. Напряженность поля возрастает с увеличением плотности тока, уменьшением площади сечения электрофоретической ячейки и электропроводности.

В методе зонного электрофореза миграция ионов осуществляется по поверхности или через объем неподвижного носителя (бумага, диски, колонки и др.). Процессы разделения проводят также в различных гелях (гель-электрофорез) на основе крахмала, агарозы и полиамидов.

Различают низковольтный (1000 В) и высоковольтный (1000–10000 В) электрофорез. Высоковольтный электрофорез чаще проводят на бумаге, он дает хорошие результаты при анализе небольших молекул, например аминокислот.

В **методе изоэлектрического фокусирования** при определении амфолитов (аминокислоты, пептиды) буферной смесью создается градиент pH. Амфолиты при значении pH, соответствующем

их изоэлектрической точке, в электрическом поле не движутся. В этом методе достигается хорошее разделение амфолитов, так как они мигрируют к изоэлектрической точке и концентрируются.

В **методе изотахофореза** (от греч. *isos* — равный и *tachos* — скорость) скорость движения различных ионов в электрическом поле одинаковая. Разделение основано на использовании двух электролитов: один электролит (ведущий) содержит ион с максимальной, а второй (замыкающий) — с минимальной электрофоретической активностью по сравнению с подвижностью ионов анализируемой смеси. Смесь разделяется на зоны индивидуальных компонентов, которые выходят в порядке понижения их электрофоретической активности. Для разделения и определения иммуноглобулина в качестве ведущего раствора используют морфолинэтансульфонат с рН 9, а в качестве замыкающего — раствор аминокaproата с рН 10,8.

**Метод гель-электрофореза** — это разделение смеси заряженных макромолекул, основанное на различии их зарядов, размеров и скорости миграции через гель, находящийся в электрическом поле. Селективное разделение молекул по размерам определяется свойствами матрицы геля.

В **методе иммуноэлектрофореза** применяют макропористые гели агара и агарозы. После электрофоретического разделения смеси белков обрабатывают раствором антисыворотки. Специфические антитела, содержащиеся в ней, взаимодействуют с индивидуальными компонентами белков с образованием линий осаждения, соответствующих определенному белку.

При **радиоиммуноэлектрофорезе** в антигены вводят радиоактивную метку, что повышает чувствительность этого метода по сравнению с методом иммуноэлектрофореза.

**Тонкослойный электрофорез** (ТСЭ) проводят на тонких слоях высокодисперсных сорбентов. В этом методе (аналогично ТСХ) для обнаружения разделенных веществ применяются универсальные реагенты. В качестве сорбентов для получения незакрепленного слоя используют тонкодисперсный силикагель, тонкогранулированную целлюлозу с добавкой небольшого количества сефадекса или крахмала для усиления гидрофильных свойств, что важно для сохранения влажности и улучшения прилипания слоя к подложке. Длительность разделения в зависимости от вида разделяемых смесей от 20 мин до 2 ч.

### 7.3. Капиллярный электрофорез

**Капиллярный электрофорез (КЭ)** — это современный вариант электрофореза, который сочетает в себе лучшие качества электрофореза и хроматографических методов. По аналогии с ВЭЖХ его называют высокоэффективным капиллярным электрофорезом (ВЭКЭ).

Метод КЭ, в отличие от классического электрофореза, имеет особенность, связанную с наличием электроосмотического (электроэндоосмотического) потока, возникающего в результате образования двойного электрического слоя между раствором и внутренней поверхностью капилляра.

При диссоциации силанольных групп, находящихся на внутренней поверхности кварцевого капилляра, внутренняя поверхность капилляра заряжается отрицательно и притягивает положительно заряженные противоионы. При подаче напряжения весь объем жидкости, находящейся в капилляре, движется к отрицательно заряженному электроду (катоду) — это движение и называется **электроосмотическим потоком (ЭП)**.

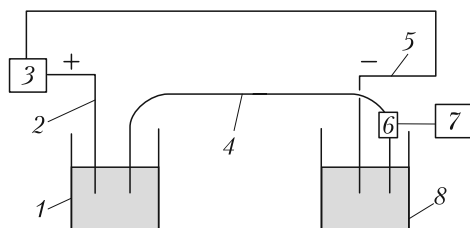
Электроосмотический поток вызывает дополнительное перемещение всего объема раствора к катоду. При этом положительные ионы движутся к катоду с большей скоростью. Вместе с электроосмотическим потоком к катоду перемещаются и все незаряженные частицы.

Относительно направления движения отрицательно заряженных частиц нет однозначного ответа. Направление их движения зависит от соотношения скоростей движения отрицательных ионов и электроосмотического потока. Если собственная скорость движения иона превышает скорость ЭП, то ион будет двигаться к аноду, в противном случае — к катоду вместе с электроосмотическим потоком, хотя и с меньшей скоростью. Детектор, установленный вблизи катода, будет регистрировать сначала катионы, затем нейтральные частицы и, в конце, некоторые анионы.

Скорость ЭП можно изменить (уменьшить, подавить, повернуть в противоположном направлении) путем соответствующей химической модификации внутренней поверхности капилляра. Применение алкилсилоксановых, фторалкильных и полиакриламидных покрытий уменьшает адсорбцию компонентов на поверхности ка-

пилляра и улучшает воспроизводимость результатов. Скорость ЭП в значительной степени зависит от величины рН раствора: чем выше рН, тем больше скорость электроосмотического потока.

Разделение смеси ионов или нейтральных молекул в методе КЭ основано на различии их электрофоретической подвижности и распределении между раствором и движущимися заряженными частицами. Методика эксперимента следующая: пробу (5–50 нл) обычно вводят на анодном конце кварцевого капилляра (длина 10–100 см, внутренний диаметр 25–100 мкм) и подают напряжение от 10 до 30 кВ (рис. 7.3).



**Рис. 7.3.** Схема устройства для капиллярного электрофореза:

- 1 — сосуд для буферного раствора и пробы; 2, 5 — электроды;  
3 — источник напряжения; 4 — капилляр; 6 — детектор; 7 — система  
регистрации данных; 8 — сосуд для буферного раствора

Капилляр содержит буферный раствор, гель или раствор полимера. Положительно заряженные частицы анализируемых соединений движутся к катоду, нейтральные и отрицательно заряженные — также передвигаются вместе с потоком жидкости, но значительно медленнее. При введении большого объема пробы наблюдается искажение пика и ухудшение разделения.

Введение пробы проводится двумя способами: гидродинамическим и электрокинетическим.

Гидродинамический способ основан на создании разности давлений между сосудом, в котором находится проба, и концом капилляра, т.е. либо повышают давление в сосуде, либо снижают давление на конце капилляра.

В электрокинетическом способе сосуд соединяется с источником напряжения и под действием короткого импульса напряжения компоненты пробы перемещаются в капилляр.

Скорость передвижения компонентов пробы в электрическом поле по капилляру зависит от заряда, структуры и молекулярной массы разделяемых компонентов. Разделение заряженных ионов происходит из-за их различной электрофоретической подвижности.

Детектор расположен вблизи противоположного конца капилляра. Определение разделенных компонентов пробы осуществляется различными детекторами (спектрофотометрический, кондуктометрический, амперометрический, потенциометрический, масс-спектральный, флуоресцентный и др.). Стандартным детектором является УФ-спектрофотометр.

Метод детектирования выбирают в зависимости от химической природы и свойств определяемых веществ: потенциометрия — ионы щелочных и щелочноземельных металлов; амперометрия — легкоокисляемые и восстанавливаемые соединения; флуоресценция — аминокислоты, ДНК, производные аминокислот и др.

Идентификацию и количественное определение компонентов пробы производят с помощью полученной электрофореграммы, состоящей из последовательных пиков.

Формула расчета подвижности ( $u$ ) частиц разделяемой смеси в капиллярном электрофорезе

$$u = \frac{l/t}{V/L}, \quad (7.3)$$

где  $l$  — длина аналитического сегмента капилляра или эффективная длина капилляра (длина капилляра до детектора);  $t$  — время движения частиц;  $V$  — напряжение;  $L$  — общая длина капилляра.

Эффективность разделения методом КЭ выражается числом  $N$  (число теоретических тарелок) и зависит от приложенного напряжения:

$$N = (u_{\text{эф}} V) / 2D, \quad (7.4)$$

где  $u_{\text{эф}}$  — сумма подвижности частиц смеси и подвижности за счет ЭП;  $D$  — коэффициент диффузии.

С повышением напряжения разделение происходит быстрее и пики становятся уже.

Основные достоинства капиллярного электрофореза: можно анализировать малые пробы, высокая эффективность разделения

( $N$  достигает 1 млн), не требуются насосы высокого давления, меньше расход высокочистых растворителей по сравнению с ВЭЖХ. Однако метод КЭ менее чувствителен, чем ВЭЖХ.

Разновидностями капиллярного электрофореза являются:

- капиллярный ионный электрофорез — разделение ионных частиц в водных растворах;
- капиллярный гель-электрофорез — капилляр заполнен гелем;
- капиллярный просеивающий электрофорез — разделение происходит через полупроницаемую мембрану (сито) за счет разницы в размерах молекул (частиц).

Дальнейший прогресс в развитии капиллярного электрофореза состоит в применении и сочетании с ним сверхчувствительных лазер-индуцированных флуоресцентных детекторов, так как диаметры лазерного луча и кварцевого капилляра соизмеримы. Это позволит определять следовые количества веществ в водных растворах.

*Метод мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографии (МЭКХ)* — это метод электрофореза, который позволяет разделять и незаряженные молекулы. Название метода неслучайное: разделение основано на распределении вещества между мицеллярной фазой (аналог подвижной фазы в хроматографии) и фазой раствора (неподвижная фаза в хроматографии). Модифицированный метод МЭКХ (добавление сульфатированного  $\beta$ -циклодекстрина) применяется для анализа биологических жидкостей.

Сущность метода состоит в том, что к буферному раствору добавляют детергент (например, додецилсульфат) и нейтральные молекулы распределяются между буфером и мицеллами в зависимости от их гидрофобности. Ядро мицеллы в водных растворах гидрофобно и может захватывать нейтральные молекулы. Внешний слой мицелл в большинстве случаев заряжен отрицательно, поэтому мицелла в электрическом поле перемещается вместе с нейтральной молекулой анализируемого вещества.

Капиллярный электрофорез широко применяется для определения аминокислот, белков, нуклеиновых кислот, лекарственных и наркотических веществ, пестицидов. Возможно определение лекарственных и наркотических веществ в плазме, сыворотке без предварительной подготовки с применением метода МЭКХ. Использование додецилсульфата способствует разрушению белков и препятствует их налипанию на стенки капилляра.

## Заключение

Выбор метода хроматографического разделения и определения веществ зависит от свойств определяемого вещества (летучесть, термоустойчивость, растворимость в воде или органических растворителях и др.).

Основное ограничение метода газовой хроматографии – требование летучести и термоустойчивости определяемых соединений. Перевод нелетучих соединений в летучие значительно усложняет анализ. Однако метод газовой хроматографии имеет ряд достоинств: нет необходимости использования значительного количества специально очищенных растворителей, высокая чувствительность и избирательность метода, малый объем вводимой пробы, газовые хроматографы дешевле жидкостных. Актуальным направлением в развитии газовой хроматографии является создание высокоскоростных и портативных газовых хроматографов, использующих атмосферный воздух вместо специальных газов-носителей в баллоне под высоким давлением. Вакуум-насос, устанавливаемый после колонки, позволяет осуществлять поток подвижной фазы.

В последние годы ВЭЖХ становится наиболее востребованным методом, что объясняется его особенностями: отпадают требования по летучести и термоустойчивости определяемых веществ, обращенно-фазовая ВЭЖХ позволяет работать с водными растворами, выбор более специфического способа детектирования позволяет повысить избирательность. Однако метод ВЭЖХ все же имеет определенные недостатки: существующие методы детектирования не обладают высокой чувствительностью, требуется применение большого количества дорогих высокочистых растворителей, жидкостные хроматографы дороже газовых, а наполнение колонок производится в заводских условиях.

Основными тенденциями развития ВЭЖХ являются миниатюризация и сокращение времени анализа. Применение микроколонок позволяет работать с пробами менее 1 мкл. Предложены неподвижные фазы новых типов на основе полимерных матриц с молекулярными отпечатками (размер пор является оптимальным для определенных веществ). Созданы электропроводящие полимеры, используемые в качестве неподвижных фаз, свойства которых можно изменять, регулируя величину приложенного электрического напряжения.

Возрастает роль практического применения сверхкритической флюидной хроматографии, особенно в области анализа лекарственных средств и полупродуктов их синтеза.

Интенсивно развивается новое направление колоночной жидкостной хроматографии – ВЭЖХ при сверхвысоких температурах и давлениях. Например, смесь алкилфенолов при сверхвысоких температурах можно разделить примерно в 50 раз быстрее, чем в обычной ВЭЖХ. Применение перегретой (до 190 °С) воды вместо водно-органической смеси в обращенно-фазовой ВЭЖХ позволяет использовать для детектирования  $^1\text{H}$  метод ЯМР.

Более простым, дешевым и доступным является метод тонкослойной хроматографии. К основным достоинствам ТСХ можно отнести: низкую стоимость оборудования и материалов, возможность разделения многих образцов на одной пластине, возможность сохранения пластины с разделенными образцами и последующее детектирование веществ, легкость смены растворителей для оптимизации селективности. Способы детектирования в ТСХ постоянно совершенствуются; кроме традиционных фото- и флуориметрических методов, в настоящее время применяются масс-спектрометрическое детектирование с лазерной десорбцией-ионизацией, а также сканирующая лазерная денситометрия.

Недостатки ТСХ — более низкая чувствительность по сравнению с колоночной жидкостной хроматографией, ограниченная разрешающая способность из-за малой протяженности разделяющего участка, зависимость результатов разделения от окружающей среды в связи с использованием «открытой» системы.

Сочетание методов хроматографии и масс-спектроскопии позволяет резко увеличить объем информации о веществе. Возрастает роль системы жидкостная хроматография – масс-спектрометрия.

Метод капиллярного электрофореза позволяет проводить большинство анализов смесей аминокислот, пептидов, белков, нуклеиновых кислот и других биополимеров. Методом электрофореза можно определять и низкомолекулярные ионы в биологических жидкостях. Динамический диапазон при определении катионов и анионов в биологических жидкостях составляет три порядка. Метод мицеллярной электрокинетической хроматографии дает возможность определять и нейтральные молекулы (например, фенолы).



---

Рассмотренные в настоящем пособии хроматографические методы анализа взаимно дополняют друг друга, поэтому на практике выбирать конкретные методы следует в зависимости от аналитической задачи и свойств анализируемого образца.

## Словарь основных терминов

Основные понятия и терминология в хроматографии систематизированы и унифицированы комиссией ИЮПАК (International Union of Pure and Applied Chemistry).

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

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

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

**Геометрический объем колонки** – внутреннее пространство пустой колонки.

**Гидродинамическая хроматография** – жидкостная хроматография, в которой роль неподвижной фазы играют стенки колонки (канала). Разделение смеси макромолекул или частиц происходит вследствие различий скоростей протекания подвижной фазы вдоль оси канала и у его стенок, а также за счет распределения разделяемых частиц по сечению канала в соответствии с их размером. Вместо колонки может применяться полый капилляр (капиллярная гидродинамическая хроматография).

**Гидрофильная хроматография** – жидкостная хроматография на полярных сорбентах, в которой в качестве подвижной фазы используются водно-органические растворы. Разделение смеси веществ происходит из-за разницы в их взаимодействии с полярными группами сорбента в условиях убывающего градиента органического модификатора в элюенте.

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

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

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

**Дрейф нулевой линии** – постепенное смещение нулевой линии, регистрируемое на хроматограмме.

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

**Инжектор (дозатор)** – устройство для ввода анализируемой пробы.

**Капиллярная жидкостная хроматография** – колоночная хроматография, в которой используют капилляры с внутренним диаметром  $\leq 0,5$  мм.

**Критическая хроматография** – жидкостная хроматография олигомеров или полимеров в таких условиях (состав смешанного элюента, температура, природа и пористая структура сорбента), когда адсорбционные взаимодействия с сорбентом компенсированы эксклюзионными эффектами, так что удерживание макромолекул определяется не их размером, а наличием специфических (концевых) функциональных групп или топологией молекулы (циклы, разветвления).

**Мертвое время** – время пребывания несорбируемого вещества в хроматографе. Мертвое время определяют от момента ввода пробы несорбируемого вещества в хроматограф до момента регистрации максимума сигнала детектора.

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

**Микроколоночная хроматография** – жидкостная колоночная хроматография, в которой используются колонки с внутренним диаметром  $\leq 2$  мм.

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

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

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

**Мультихроматография** – неоднократно повторяемая хроматография в системе из двух колонок с неподвижными фазами одинаковой или различной химической природы, при которой селективность системы варьируют, изменяя по заданному закону физические условия разделения (градиент давления или расхода подвижной фазы, градиент температуры) в одной или двух колонках.

**Неподвижная фаза** – твердый сорбент или несмешивающаяся с подвижной фазой жидкость, на которых происходит разделение компонентов смеси.

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

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

**Обращенно-фазовая хроматография (ОФХ)** – жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная. Это вариант распределительной хроматографии, когда используются сорбенты с привитыми неполярными группами (длинные алкильные и алкилсилильные) и полярный растворитель (водно-метанольные или водно-ацетонитрильные смеси).

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

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

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

**Площадь пика** – площадь хроматограммы, заключенная между пиком и его основанием.

**Подвижная фаза** – поток газа или жидкости, перемещающий компоненты анализируемой смеси вдоль неподвижной фазы.

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

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

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

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

**Хроматограмма** – наглядное изображение результатов разделения компонентов исходной смеси в плоскостной хроматографии (в тонком слое сорбента, на бумаге и т.д.).

**Хроматографическая колонка** – трубка, заполненная сорбентом или содержащая сорбент на внутренней поверхности.

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

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

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

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

**Хроматография с программированием температуры** – элюентная хроматография, при которой температура колонки в процессе разделения компонентов изменяется по заданному закону.

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

**Ширина пика на полувысоте ( $w_h$ )** – отсекаемый пиком отрезок линии, проведенной параллельно основанию пика на середине его высоты.

**Ширина пика у основания ( $w_b$ )** – отрезок основания пика, отсекаемый двумя касательными, проведенными в точках перегибов восходящей и нисходящей ветвей хроматографического пика.

**Шум** – помехи, статистические флуктуации нулевой линии хроматограммы.

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

**Электрохроматография** – жидкостная хроматография, в которой в качестве побудителя движения подвижной фазы использу-

ется электрическое поле, вызывающее электроосмотическое перемещение жидкой фазы вдоль поверхности твердой фазы.

**Элюат** – поток подвижной фазы, выходящий из колонки и содержащий компоненты разделяемой смеси.

**Элюент** – жидкость или газ, используемые в качестве подвижной фазы. Элюент – синоним термина «подвижная фаза».

**Элюирующая сила подвижной фазы** – свойство вступать в межмолекулярные взаимодействия с компонентами хроматографической системы, которые способствуют десорбции и быстрому перемещению компонентов смеси.

**Элюотропный ряд** – серия чистых или смешанных растворителей, расположенных в порядке возрастания их элюирующей способности.

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

**Эффективность колонки** – характеристика качества колонки, определяемая числом теоретических тарелок и высотой теоретической тарелки.

## Приложения

### 1. Растворители и адсорбенты, применяемые в жидкостной адсорбционной хроматографии

Разделяемые смеси веществ	Растворители	Адсорбенты
Углеводороды	Пентан, петролейный эфир, бензин, изооктан, хлороформ, тетрахлорид углерода, хлорбензол, бензол, диэтиловый спирт, ацетон	Активированный оксид алюминия, силикагели различных марок, алюмосиликатный катализатор
Галоидопроизводные углеводов	Пентан, изооктан, петролейный эфир, тетрахлорид углерода	Силикагели различных марок, активированный оксид алюминия
Спирты	Изопропиловый спирт, бутиловый спирт, диэтиловый эфир, хлороформ, диоксан, бензол, петролейный эфир	Активированный уголь, оксид алюминия, силикагели
Фенолы	Петролейный эфир, бензол, диэтиловый эфир, этиловый спирт	Оксид алюминия, оксид кальция
Альдегиды и кетоны	Петролейный эфир, бензол, диэтиловый эфир, тетрахлорид углерода, сероуглерод	Оксид алюминия, оксид магния, тальк, силикагели
Карбоновые кислоты	Бензол, петролейный эфир, этанол, гептан, нитропропан, вода (для низших кислот)	Тальк, активированный уголь, оксид алюминия, силикагели
Сложные эфиры	Петролейный эфир, бензол, тетрахлорид углерода, хлороформ, гексан	Оксид алюминия, силикагели, активированный уголь
Хиноны	Бензол, гексан, этиловый спирт, ацетон, метиловый спирт	Оксид алюминия, кизельгур
Амины, амиды	Петролейный эфир, бензол, тетрахлорид углерода, диэтиловый эфир	Силикагели, оксид алюминия



Разделяемые смеси веществ	Растворители	Адсорбенты
Нитро- и нитрозосоединения	Бензол, петролейный эфир, метиленхлорид	Тальк, гидроксид кальция, карбонат кальция, силикагели, оксид алюминия
Сульфокислоты	Вода	Оксид алюминия
Углеводы	Вода, изопропиловый спирт, этиловый спирт, бутиловый спирт, диоксан, петролейный эфир, бензол, хлороформ	Боксит, активированный уголь, силикагели, оксид алюминия
Аминокислоты	Вода, метиловый спирт, водный раствор формальдегида, диэтиловый эфир, раствор фенола, <i>m</i> -крезол, хлороформ	Активированный уголь, силикагели, оксид алюминия, диоксид титана, крахмал
Гетероциклические соединения	Бутиловый спирт, диэтиловый эфир, хлороформ, петролейный эфир, бензол, этиловый спирт, ацетон, 0,004 н. раствор хлороводородной кислоты, вода, уксусная кислота	Оксид алюминия, гидроксид кальция, крахмал, силикагели, кизельгур, карбонат кальция, тальк, сахар
Алкалоиды	Вода, бензол, хлороформ, диэтиловый эфир, этиловый спирт, ацетон, раствор фенола	Оксид алюминия, силикагели, фуллерова земля
Витамины	Петролейный эфир, бензол, вода, этилацетат, этиловый спирт	Оксид алюминия, гидроксид кальция, оксид магния
Терпены	Тетрахлорид углерода, петролейный эфир, гексан, бензол, диэтиловый эфир, ацетон, метиловый спирт, этилацетат, хлороформ	Оксид алюминия
Сероорганические соединения	Петролейный эфир, изоктан, бензол, спиртобензольная смесь, этиловый спирт, ацетон	Силикагели, оксид алюминия

## 2. Параметры полярности растворителей при 25 °С [20]

Растворитель	$\epsilon_r$	$\mu$ , D	$\delta_r$ , МПа <sup>1/2</sup>	$E_T$ (30), кДж/моль	$P'$
Амилол	13,90	1,80	20,05	205,4	3,5
Изоамилол	14,70	1,82	—	205,0	3,6
Анизол	4,33	1,25	18,61	155,2	3,5
Анилин	6,99	1,51	21,10	185,3	6,3
Ацетон	20,54	2,70	21,50	176,6	5,1
Ацетонитрил	35,94	3,44	26,90	190,8	5,8
Бензол	2,23	0,00	19,86	143,5	2,7
Бутан-1-ол	17,10	1,66	23,30	210,1	3,9
Бутан-2-ол	16,40	1,55	22,09	197,1	4,0
Изобутанол	18,50	1,79	20,86	203,3	4,0
Бутилацетат	5,10	1,84	17,39	161,1	—
Вода	78,54	1,83	52,20	264,0	10,2
Гексан	1,88	0,08	15,84	129,7	0,1
Гептан	1,93	0,00	16,18	130,1	0,2
Глицерин	42,50	2,56	—	238,5	—
Диизопропиловый эфир	3,88	1,13	14,52	142,7	2,4
ДМСО	48,50	3,96	26,18	188,7	6,4
ДМФА	36,71	3,80	24,14	183,3	6,4
1,4-Диоксан	2,21	0,45	21,78	150,6	4,8
1,2-Дихлорэтан	10,38	1,86	21,76	172,8	3,8
Диэтиламин	3,80	1,11	—	148,1	—
Диэтиленгликоль	29,40	2,31	26,80	225,1	5,0
Диэтиловый эфир	4,27	1,15	16,20	144,4	2,8
Изооктан	1,94	0,00	14,99	130,1	0,1
<i>мета</i> -Крезол	11,80	1,54	—	223,4	7,0
<i>пара</i> -Ксилол	2,27	0,02	17,94	138,5	2,4
Метанол	32,66	1,70	32,42	231,8	5,1
Метилацетат	6,68	1,61	18,82	167,4	—
Метилизобутилкетон	13,10	2,79	17,18	164,8	4,2

## Окончание приложения 2

Растворитель	$\varepsilon_T$	$\mu$ , D	$\delta_T$ , МПа <sup>1/2</sup>	$E_T$ (30), кДж/моль	$P'$
Муравьиная кислота	58,00	1,41	24,75	227,2	—
Нитробензол	35,50	4,03	22,70	165,8	4,5
Нитрометан	37,78	3,56	27,70	193,3	6,0
Октан-1-ол	10,00	1,76	21,70	194,4	3,4
Пентан	1,84	0,00	15,65	129,7	0,0
Петролейный эфир	1,90	0,00	—	—	—
Пиперидин	5,80	1,17	—	—	—
Пиридин	12,40	2,37	21,27	169,5	5,3
Пропан-1-ол	20,33	1,657	25,10	212,2	4,0
Пропан-2-ол	19,13	1,66	25,30	202,5	3,9
Сероуглерод	2,60	0,06	20,45	137,2	1,0
ТГФ	7,39	1,75	20,21	156,5	4,0
Толуол	2,37	0,36	19,49	141,8	2,4
Трифторуксусная кислота	8,26	2,28	—	—	—
Триэтиламин	2,42	0,66	15,34	134,3	1,9
Уксусная кислота	6,30	1,70	20,70	216,4	6,0
Формамид	111,00	3,37	36,61	237,2	7,3
Хлорбензол	5,62	1,53	19,40	156,9	2,7
Хлористый метилен	8,93	1,14	21,85	170,3	3,1
Хлороформ	4,72	1,15	20,19	163,5	4,1
Циклогексан	2,02	0,00	16,77	129,4	0,2
Циклогексанон	18,3 <sup>(20)</sup>	3,01	20,30	166,5	4,5
Циклогексен	2,22	0,51	—	—	—
Циклопентан	1,97	0,00	16,57	—	0,1
Тетрахлорметан	2,23	0,00	17,59	135,5	1,6
Этанол	24,55	1,68	27,92	217,1	4,3
Этилацетат	6,02	1,88	19,58	159,5	4,4
Этилбензол	2,40	0,35	17,98	—	—
Этиленгликоль	37,70	2,28	34,77	235,6	6,9

### 3. Свойства растворителей, применяемых в жидкостной хроматографии [4]

Растворитель	$t_{\text{кип}},$ С°	Плотность, $d_{20}$	Вязкость при 25 °С, сП	Коэффициент преломления, $n_D^{20}$	Предел про- зрач- ности для УФ- света, нм	Элюирующая сила $\epsilon^\circ$ на силика- геле
Ацетонитрил	82	0,78	0,34	1,314	190	0,50
Бензол	80	0,88	0,60	1,498	280	0,10
Вода	100	1,00	0,89	1,333	—	1,50
Гексан	69	0,66	0,30	1,372	190	0,01
Гептан	98	0,68	0,40	1,385	195	0,01
Диметилформамид	153	0,94	0,80	1,428	268	1,00
Диоксан	101	1,03	1,2	1,420	215	0,45
Дихлорэтан	83	1,25	0,78	1,442	228	0,20
Диэтиловый эфир	35	0,71	0,24	1,350	218	0,30
Изооктан	99	0,69	0,47	1,389	197	0,01
Метанол	65	0,79	0,54	1,326	205	0,7
Метиленхлорид	40	1,33	—	1,421	233	0,32
Метилэтилкетон	80	0,86	0,38	1,376	329	0,40
Пентан	36	0,63	0,22	1,355	195	0,01
Пропанол-1	97	0,80	1,9	1,385	240	0,55
Пропанол-2	82	0,79	1,9	1,384	205	0,55
Тетрагидрофуран	66	0,89	0,46	1,405	212	0,44
Тетрахлорид углерода	77	1,60	0,90	1,457	265	0,1
Толуол	110	0,87	0,55	1,494	285	0,10
Триэтиламин	89	0,73	0,36	1,398	—	—
Уксусная кислота	118	1,05	1,1	1,370	—	—
Хлороформ	61	1,49	0,53	1,443	245	0,26
Циклогексан	81	0,78	0,90	1,423	200	0,02
Этанол	78	0,79	1,08	1,359	210	0,60
Этилацетат	77	0,90	0,43	1,370	256	0,38

#### 4. Спектрофотометрическое детектирование модифицированных производных природных соединений

Соединения	$\lambda$ , нм	Модифицирующий реагент
Аминокислоты	208, 254, 350–360	2,4-динитро-1-фторбензол
	208, 250, 254	Дансилхлорид
	254–269	Фенилизотиоцианат
	436	Диметиламиноазобензол-сульфанилхлорид
Пептиды	436	Диметиламиноазобензолсульфанилхлорид
Белки	280	Флуорескамин
Биогенные амины	208, 250, 254	Дансилхлорид
Жирные кислоты	254	2-бром-1-фенилэтанон
Фосфолипиды	254–260	4-нитрофенил-карбонилхлорид
Гликолипиды	230	Бензоилхлорид
Моно- и дисахариды	230–260	Бензоилхлорид, 4-нитробензоилхлорид

#### 5. Спектральные характеристики флуоресцирующих лекарственных веществ

Соединение	$\lambda_{\text{взб}}$ , нм	$\lambda_{\text{флр}}$ , нм	Соединение	$\lambda_{\text{взб}}$ , нм	$\lambda_{\text{флр}}$ , нм
Ампицилин	345	420	Метопролол	280	300
Анаприлин	200	310–330	Пиндолол	220	360
Апоморфин	281	418	Ретинол	325	480
Атенолол	280	300	Рубомицин	480	560
Бетаксолол	275, 285	305, 330	Тиогуанин	330	389
Верапамил	280	314	Токоферол	295	390
Гентамицин	275, 365	418, 440	Фуросемид	275, 233	410, 389
Глауцин	310	340	Хинидин	340	418
Индометацин	305	370	Хинин	350	450
Карминомицин	470	550	Хлорбутин	285	320
Лоназолак	282	389	Цефалексин	345	420
Метолазон	230	420	Циталопам	240	300

## 6. Соединения, обнаруживаемые флуориметрическим детектором после их химической модификации

Соединение	Модифицирующий агент	$\lambda_{\text{взб}}, \text{ нм}$	$\lambda_{\text{флр}}, \text{ нм}$
Аминокислоты	Флуорескамин	275	370
	Фталевый ангидрид	305–395	420–650
	Дансилхлорид	340	510
Аминосахара	Флуорескамин	275	370
Биогенные алифатические амины	Флуорескамин	275	370
Катехоламины	Фталевый альдегид	355	418
Меркаптаны	4-аминосульфонил-7-фтор-2,1,3-бензоксадиазол	380	510
Карбаматы	Фталевый альдегид	339	445
Пептидные гормоны, инсулин	Флуорескамин	275–280	370
Моно-, ди-, трисахариды	7-амино-1,3-нафталин-дисульфокислота	255	450

## 7. Миксотропная серия растворителей [11]

Вода	Пропионовая кислота	Изоамиловый спирт
Молочная кислота	Тетрагидрофуран	1-Пентанол
Формамид	<i>трет</i> -Бутанол	Бензиловый спирт
Морфолин	Изомасляная кислота	Этилацетат
Муравьиная кислота	2-Бутанол	1-Гексанол
Ацетонитрил	Метилэтилкетон	<i>симм</i> -Коллидин
Метанол	Циклогексанол	Пентановая кислота
Уксусная кислота	Фенол	Этилформиат
Этанол	<i>трет</i> -Амиловый спирт	Изовалериановая кислота
2-Пропанол	1-Бутанол	Фуран
Ацетон	<i>м</i> -Крезол	Диэтиловый эфир
1-Пропанол	Циклогексанол	1-Октанол
1,4-Диоксан		

Диэтоксиметан	Хлороформ	Тетрахлорид углерода
Капроновая кислота	Диизоамиловый эфир	Сероуглерод
Бутилацетат	1,2-Дихлорэтан	Декалин
Диизопропоксиметан	Бромбензол	Циклопентан
Нитрометан	1,1,2-Трихлорэтан	Циклогексан
1-Бромбутан	1,2-Дибромэтан	Гексан
Диизопропиловый эфир	Бромэтан	Гептан
Бутилбутират	Бензол	Керосин
1-Бромпропан	1-Хлорпропан	Петролейный эфир
Дибутиловый эфир	Трихлорэтилен	Парафиновое масло
Метиленхлорид	Толуол	
	Ксилол	

*Примечания:* 1. Растворители, расположенные до *трет*-бутанола, смешиваются с водой в любых соотношениях. 2. Растворители даны в порядке уменьшения их гидрофильности.

## 8. Проявители для ТСХ [1]

Проявляемые вещества	Состав проявителей
<i>А. Проявители для органических веществ</i>	
Органические вещества (общий тест)	10%-ный раствор дихромата натрия в 50%-ной серной кислоте ( опрыскивать осторожно!). Пары йода (насыщают камеру, в которой выдерживают пластинку 10–15 мин). Раствор 0,5 г перманганата калия в 15 мл конц. $H_2SO_4$ (опрыскивать осторожно, в маске!). Опрыскивание концентрированной $H_2SO_4$ , затем нагревание в течение 10–15 мин при 80–120 °С. Обнаружение в видимом и УФ-свете (осторожно!)
Альдегиды и кетоны	Растворяют 150 мг 2,4-динитрофенилгидразина в смеси 25 мл воды и 22 мл конц. хлороводородной кислоты. Затем все разбавляют до 100 мл

Проявляемые вещества	Состав проявителей
Аминокислоты	<p><i>Раствор I.</i> 0,2%-ный раствор нингидрина в 50 мл абсолютного этанола, 10 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл 2,4,6-коллоидина. <i>Раствор II.</i> 1%-ный раствор <math>\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}</math> в абсолютном этаноле. Перед опрыскиванием растворы I и II сливают в соотношении 50 : 3. Перед опрыскиванием пластинку высушивают, прогревая 10 мин при 100 °С, после опрыскивания нагревают при 110 °С в течение 4 мин</p>
Амины	<p>Свежеприготовленный раствор 0,1 г соли диазония в 20 мл 10%-ного раствора <math>\text{Na}_2\text{CO}_3</math>. Соль диазония готовят следующим образом: 25 г сульфаниловой кислоты растворяют в 125 мл 10%-ного раствора КОН, после охлаждения добавляют 100 мл 10%-ного раствора <math>\text{NaNO}_2</math>. Полученный раствор при размешивании добавляют по каплям в охлажденный во льду раствор соляной кислоты, так чтобы температура раствора была не выше 8 °С. Раствор соляной кислоты получают смешиванием 40 мл кислоты (плотн. 1,19 г/мл) с 20 мл воды. Полученную диазониевую соль отфильтровывают, промывают охлажденной во льду водой, затем этанолом и диэтиловым эфиром, сушат на воздухе. Хранят соль в темной таре.</p> <p><i>Реагент Драгендорфа.</i> К раствору 850 мг основного нитрата висмута в 40 мл воды и 10 мл уксусной кислоты добавляют раствор 8 г иодида калия в 20 мл воды. Перед опрыскиванием 1 мл этого раствора разбавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты и 10 мл воды</p>
Ароматические соединения	<p>Раствор 50 мг натрийфлуоресцеина в 100 мл 50%-ного метанола или щелочной раствор флуоресцеина. Обнаружение проводят в УФ-свете.</p> <p>3%-ный раствор бромкрезолового зеленого, бромкрезолового синего или других кислотных индикаторов в 80%-ном метаноле. Добавляют 8 капель 30%-ного раствора <math>\text{NaOH}</math> в 100 мл исходного раствора.</p> <p>0,25%-ный раствор родамина Б в 96%-ном этаноле.</p> <p>10%-ный раствор фосфорномолибденовой кислоты в 96%-ном этаноле. После опрыскивания пластинку нагревают до 100 °С</p>



Проявляемые вещества	Состав проявителей
Липиды	<p>Раствор 0,04 г бромтимолового синего в 100 мл 0,01М раствора NaOH.</p> <p>0,2%-ный раствор 2',7'- дихлорфлуоресцеина в 96%-ном этаноле.</p> <p>Применяют также проявители для кислот (фосфорномолибденовую кислоту и родамин Б)</p>
Меркаптаны	2%-ный раствор нитропрусида натрия в 75%-ном этаноле
Сахара	<p><i>Раствор I.</i> 2 н. раствор анилина в воде, насыщенной <i>n</i>-бутанолом. <i>Раствор II.</i> 2 н. раствор ортофосфорной кислоты в <i>n</i>-бутаноле. Перед опрыскиванием растворы I и II <b>смешивают в соотношении 1:2. После опрыскивания</b> пластинку нагревают 5 мин при 105 °С.</p> <p>Раствор 0,93 г анилина и 1,66 г <i>o</i>-фталевой кислоты в 100 мл воды, насыщенной <i>n</i>-бутанолом. После опрыскивания пластинку нагревают 10 мин при 105 °С.</p> <p>Раствор 0,5 мл анисового альдегида и 0,5 мл конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в 9 мл 96%-ного этанола с 0,1 мл ледяной уксусной кислоты. Раствор также применяют для проявления пятен стероидов и терпенов</p>
Спирты	<p>5%-ный раствор AgNO<sub>3</sub> в 10%-ном растворе аммиака. После опрыскивания пластинку сушат 5 мин при 140 °С.</p> <p>Применяют также обработку парами иода</p>
Спирты многоатомные и гликоли	<p>Опрыскивание конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (осторожно!) и нагревание при 120 °С.</p> <p>Смесь концентрированных H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и HNO<sub>3</sub> (95:5) (осторожно!). После опрыскивания пластинку нагревают при 110 °С. Обнаружение проводят в УФ-свете</p> <p>5 мл хлорсульфоновой кислоты осторожно растворяют в 10 мл ледяной уксусной кислоты при охлаждении. Этим раствором опрыскивают пластинку, которую затем нагревают 5 мин при 130 °С. Обнаружение проводят в УФ-свете</p>
Тиофен и его производные	0,4%-ный раствор изатина в конц. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (осторожно!) Обнаружение проводят в УФ-свете

Проявляемые вещества	Состав проявителей
Фенолы	Фенолы проявляют раствором диазотированной сульфаниловой кислоты (см. Амины)
Хлорированные углеводороды	Раствор 0,5 г хлоргидрата N,N-диметил- <i>n</i> -фенилендиамина в 100 мл 96%-ного этанола, содержащего 1 г металлического натрия (в растворе этилата натрия). После опрыскивания раствором пластинку опрыскивают водой, затем сушат при нагревании
<i>Б. Проявители для неорганических ионов</i>	
Щелочные и щелочноземельные элементы, $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$	1,5%-ный водный раствор виолуровой кислоты. 1%-ный раствор рубеоноводородной кислоты в 96%-ном этаноле
Переходные элементы	0,5%-ный раствор 8-оксихинолина в 96%-ном этаноле, насыщение парами аммиака, обнаружение в УФ-свете
Re, Mo, V, W, Pt, Pd	10%-ный раствор $\text{SnCl}_2$ в конц. HCl
Rh, Ir	50%-ный водный раствор роданида калия
As, Sb, Sn	5%-ный водный раствор сульфата меди
As, Sb, Bi	Пары сероводорода
Лантаноиды	1%-ный раствор 8-оксихинолина в 50%-ном этаноле (метаноле). 0,1%-ный водный раствор арсеназо III. Проявляются, кроме лантаноидов, торий и уран
Галогениды	1%-ный раствор бромкрезолового красного в 80%-ном этаноле. 1%-ный аммиачный раствор нитрата серебра
$\text{ClO}_3^-$ , $\text{BrO}_3^-$ , $\text{IO}_3^-$ , $\text{NO}_2^-$ , $\text{CrO}_4^{2-}$	1%-ный раствор иодида калия в 0,1М HCl
Фосфаты	1%-ный водный раствор молибдата аммония
Сульфаты	0,1 М аммиачный раствор нитрата серебра и 0,1%-ный раствор бромкрезолового зеленого в разбавленном растворе аммиака

Проявляемые вещества	Состав проявителей
Бораты	0,1%-ный водный раствор конго красного
Перхлораты	0,05%-ный водный раствор метилового голубого
Молибдаты	10%-ный раствор фенилгидразина в диэтиловом эфире. Нагревание до 150 °С (осторожно, вдали от открытого огня)

## Литература

1. Айвазов, Б.В. Введение в хроматографию / Б.В. Айвазов. М. : Высш. шк., 1983. 240 с.
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы: в 2 т. / Р. Кельнер [и др.]. М. : Мир; Аст, 2004. Т.1. 606 с. Т. 2. 728 с.
3. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа/ под ред. О.М. Петрухина. М. : Химия, 2001. 496 с.
4. Аналитическая хроматография / К.И. Сакодынский [и др.]. М. : Химия, 1993. 464 с.
5. Белявская, Т.А. Хроматография неорганических веществ / Т.А. Белявская, Т.А. Большова, Г.Д. Брыкина. М. : Высш. шк., 1986. 207 с.
6. Винарский, В.А. Хроматография: курс лекций: в 2 ч. / В.А. Винарский. Минск : БГУ, 2002. Ч. 1. Газовая хроматография. 192 с.
7. Винарский, В.А. Хроматография: курс лекций: в 2 ч. / В.А. Винарский, Р.А. Юрченко. Минск : БГУ, 2008. Ч. 2. Жидкостная хроматография. 163 с.
8. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецкеи. М. : Мир, 1982. 448 с.
9. Гейсс, Ф. Основы тонкослойной хроматографии: в 2 т. / Ф. Гейсс. М. : Мир, 1999. Т.1. 405 с. Т. 2. 348 с.
10. Гольберт, К.А. Введение в газовую хроматографию / К.А. Гольберт, М.С. Вигдергауз. М. : Химия, 1990. 352 с.
11. Гордон, А. Спутник химика / А. Гордон, Р. Форд. М. : Мир, 1976. 542 с.
12. Золотов, Ю.А. Очерки аналитической химии / Ю.А. Золотов. М. : Химия, 1977. 240 с.
13. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография: в 2 т. / Ю. Кирхнер. М. : Мир, 1981. Т. 1. 616 с. Т. 2. 524 с.
14. Основы аналитической химии: в 2 кн. / Ю.А. Золотов [и др.]. М. : Высш. шк., 1996. Кн.1: Общие вопросы. Методы разделения. 383 с.
15. Основы биофизической и коллоидной химии / Е.В. Барковский [и др.]. Минск : Вышэйш. шк., 2009. 416 с.
16. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультра-центрифугирование: практ. пособие / Л.А. Остерман. М. : Наука, 1981. 288 с.

17. *Отто, М.* Современные методы аналитической химии / М. Отто. М. : Техносфера, 2008. 544 с.
18. *Райхардт, К.* Растворители и эффекты среды в органической химии / К. Райхардт. М. : Мир, 1991. 763 с.
19. Руководство по капиллярному электрофорезу / под ред. А.М. Волошука. М. : Наука, 1996. 111 с.
20. Спутник хроматографиста / О.Б. Рудаков [и др.]. Воронеж : Водолей, 2004. 528 с.
21. *Стыскин, Е.Л.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ициксон, Е.В. Брауде. М. : Химия, 1986. 204 с.
22. Токсикологическая химия / под ред.. Н.И. Калетиной. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. 1016 с.
23. Токсикологическая химия / под ред. Т.В. Плетеневой. М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. 512 с.
24. *Хмельницкий, Р.А.* Хромато-масс-спектрометрия / Р.А. Хмельницкий, Е.С. Бродский. М. : Химия, 1984. 216 с.
25. Хроматография в тонких слоях / под ред. Э. Шталя. М. : Мир, 1965. 508 с.
26. Хроматография. Основные понятия. Терминология. : сб. научно-нормативной терминологии / под ред. В.А. Даванкова. М. : Комитет научной терминологии РАН, 1997. Вып. 114. 48 с.
27. *Шатц, В.Д.* Высокоэффективная жидкостная хроматография / В.Д. Шатц, О.В. Сахартова. Рига : Зинатне 1988. 390 с.

*По вопросам приобретения книг обращайтесь:*

---

**Республика Беларусь**

ООО «Новое знание»  
220050, а/я 79, Минск,  
пр. Пушкина, д. 15а  
Тел./факс: (10-375-17) 211-50-38  
E-mail: nk@wnk.biz  
<http://wnk.biz>

**Российская Федерация**

*Отдел оптовых продаж «ИНФРА-М»:*  
127282, Москва, ул. Полярная, д. 31в, стр. 1  
Тел. (495) 380-4260; факс (495) 363-9212  
E-mail: books@infra-m.ru  
*Отдел «Книга—почтой»:*  
Тел. (495) 363-4260 (доб. 232, 246)

---

*Учебное издание*

*Высшее образование*

**Жебентяев Александр Ильич**

**АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ.  
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА**

**Учебное пособие**

Ведущий редактор	С.В. Исаенко
Редактор	А.П. Чернякова
Художник обложки	С.В. Ковалевский
Компьютерная верстка	З.В. Шиманович
Корректор	К.А. Степанова

Оригинал-макет подготовлен ООО «Новое знание»

Подписано в печать 25.11.2012.

Формат 60×90  $\frac{1}{16}$ . Бумага офсетная. Гарнитура Школьная.

Печать офсетная. Усл. печ. л. 13. Уч.-изд. л. 10,65.

Тираж 1000 экз. Заказ №

ТК 426750-12157-251112

Общество с ограниченной ответственностью «Новое знание».

ЛИ № 02330/0552555 от 08.04.2009.

Ул. Шаранговича, 7-2136, Минск, Республика Беларусь.

Почтовый адрес: а/я 79, 220050, Минск, Республика Беларусь.

Телефон/факс: (10-375-17) 211-50-38

E-mail: nk@wnk.biz <http://wnk.biz>

ООО «Научно-издательский центр ИНФРА-М»

127282, Москва, ул. Полярная, д. 31В, стр. 1

Тел.: (495) 380-05-40, 380-05-43. Факс: (495) 363-92-12

E-mail: books@infra-m.ru <http://www.infra-m.ru>