

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.П. КОРОЛЕВА»
(САМАРСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

И.А. ПЛАТОНОВ, Е.А. НОВИКОВА, В.И. ПЛАТОНОВ

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Рекомендовано редакционно-издательским советом федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева» в качестве учебного пособия для обучающихся по основной образовательной программе высшего образования по направлению подготовки 28.03.02 Наноинженерия

САМАРА
Издательство Самарского университета
2021

УДК 543.544(075)

ББК 24.4я7

П 375

Рецензены: канд. хим. наук, доц. Р. В. Ш а ф и г у л и н,
канд. хим. наук, доц. Н. В. Н и к и т ч е н к о

Платонов, Игорь Артемьевич

П 375 Хроматографические методы анализа: учебное пособие /
И.А. Платонов, Е.А. Новикова, В.И. Платонов. – Самара:
Издательство Самарского университета, 2021. – 96 с.

ISBN 978-5-7883-1600-0

Разработано в соответствии с требованиями Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования по направлению подготовки 28.03.02 Наноинженерия (уровень бакалавриата).

Предназначено для студентов, обучающихся по направлению подготовки бакалавров 28.03.02 Наноинженерия.

Учебное пособие подготовлено на кафедре химии Самарского университета.

УДК 543.544(075)

ББК 24.4я7

ISBN 978-5-7883-1600-0

© Самарский университет, 2021

ВВЕДЕНИЕ

По выражению ведущего российского ученого А.А. Жуховицкого: «... открытие хроматографии можно сравнить с созданием микроскопа, благодаря этому методу открывается неведомый мир компонентов сложных природных и синтетических смесей...».

На сегодняшний день хроматография позволяет анализировать широкий круг объектов и используется в различных областях, включая материаловедение, экологию и охрану окружающей среды (анализ воды, воздуха и почвы, определение вредных компонентов в атмосфере, воздухе рабочей зоны и жилых помещений), медицине (определение кислорода и спирта в крови, анализ выдыхаемого воздуха для неинвазивной диагностики, определение продуктов гормональной деятельности), анализ различных лекарственных препаратов в фармакологии, анализы в судебной экспертизе и криминалистике, анализ ядов и наркотиков, допинговый контроль на спортивных соревнованиях, анализ пищевых продуктов, анализ нефти и нефтепродуктов для оценки их качества, анализ атмосферы других планет.

Необходимо отметить двустороннюю связь хроматографии и наноинженерии. С одной стороны, хроматографические методы анализа – это универсальный инструмент для обеспечения аналитического контроля химического состава объектов на различных стадиях получения наноматериалов и изделий на их основе, включая анализ сырья, контроль протекания технологических операций, оценка качества продукта, исследование его функциональных свойств. С другой стороны, достижения в области наноинженерии позволяют совершенствовать хроматографическое оборудование, в том числе за счет внедрения наноструктурных сорбентов для разделения и концентрирования, создания новых типов основных конструкционных узлов хроматографа с применением нанотехнологий и т.п.

СУТЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Простейшую хроматограмму можно получить и самому, разделив на листке фильтровальной бумаги смесь разноцветных чернил или анилиновых красок [1,2]. Смешаем чернила, получив темную жидкость неопределенного цвета. Нанесем капельку жидкости в центр бумажного листа. Затем точно в середину цветного пятнышка начнем по каплям приливать чистую воду. Каждую каплю нужно вносить только после того, как впитается предыдущая. Вода играет роль элюента, переносящего исследуемое вещество по сорбенту – пористой бумаге. Вещества, входящие в состав смеси, поглощаются бумагой по-разному: одни хорошо удерживаются ею, а другие впитываются медленнее и продолжают некоторое время растекаться вместе с водой. Вскоре по листу бумаги начнет расплзаться настоящая красочная хроматограмма: пятно одного цвета в центре, окруженное разноцветными концентрическими кольцами. Так можно получить самые разнообразные, очень красочные узоры (Рис. 1).

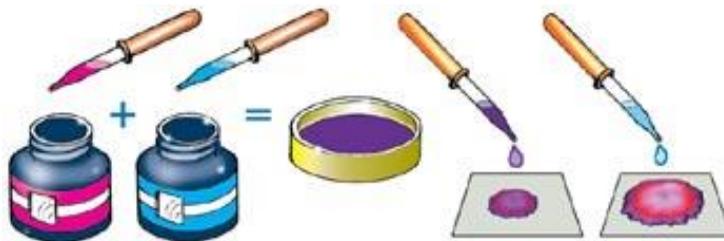


Рис. 1. Чернила на бумаге

Итак, что же представляет из себя хроматографический процесс?

Рассмотрим хроматографическую колонку. В простейшем исполнении она представляет собой трубку, заполненную сорбентом. *Сорбент* – это материал, обладающий уникальным свойством

удерживать молекулы вещества на своей поверхности. Причем, как крепко и долго будет удерживаться вещество на сорбенте зависит от свойств самого вещества, и сорбента. Например, на активированном угле с увеличением количества групп $-\text{CH}_2-$, т.е. с увеличением молекулярной массы, «удерживаемость» органического соединения будет также увеличиваться. Вещество, удерживаемое сорбентом, называют *сорбатом*. Сорбент в хроматографическом процессе будет являться неподвижной фазой.

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

Исследуемое вещество увлекается потоком подвижной фазы.

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

Данный поток жидкости, флюида или газа также называют *элюентом*, а выходящий из колонки поток подвижной фазы с компонентами разделяемой смеси веществ – *элюатом*. В газовой хроматографии подвижную фазу называют также *газом-носителем*.

Совокупность двух несмешивающихся и движущихся друг относительно друга фаз (подвижной и неподвижной) называется *хроматографической системой* [3].

Одно из наиболее удачных определений хроматографии дал М.С. Вигдергауз, охарактеризовавший ее в первую очередь как процесс. Он писал [4]:

Хроматографическими следует называть процессы, основанные на перемещении вещества (газа, жидкости или совокупности надмолеку-

лярных структур) вдоль пористого слоя или внутри ограниченного пространства в потоке, вызванном действием движущих и тормозящих сил, из которых, по крайней мере, одна зависит от молекулярной структуры или физико-химических свойств вещества.

В хроматографии обычно в качестве движущей силы выступает подвижная фаза, реже – электрическое поле (электрохроматография, капиллярный электрофорез). В качестве тормозящих сил могут выступать процессы сорбции (газо-адсорбционная и жидкостно-адсорбционная хроматография), растворения сорбатов в неподвижной жидкой фазе (газо-жидкостная и жидкостно-жидкостная хроматография), ионного обмена (ионная хроматография), проникновения молекул сорбата в поры сорбента различного размера (гель-проникающая или эксклюзионная хроматография). На рис. 2 представлена простейшая хроматографическая система, в которой поток подвижной фазы увлекает молекулы сорбата, одновременно с этим тормозящие факторы удерживают их на поверхности или в объеме сорбента. Поскольку действие тормозящих сил зависит от структуры молекулы, то одни молекулы задерживаются в колонке дольше других и в итоге могут быть выделены в виде отдельных компонентов.

С помощью регулирования таких параметров, как температура хроматографического процесса, тип сорбента, тип и скорость движения подвижной фазы и др. можно добиться оптимального разделения многокомпонентной смеси. Фракции отдельных компонентов можно собрать для последующего использования (препаративная хроматография) или они могут быть «опознаны» с помощью компьютерной программы, определяющей химический состав вещества (аналитическая хроматография).

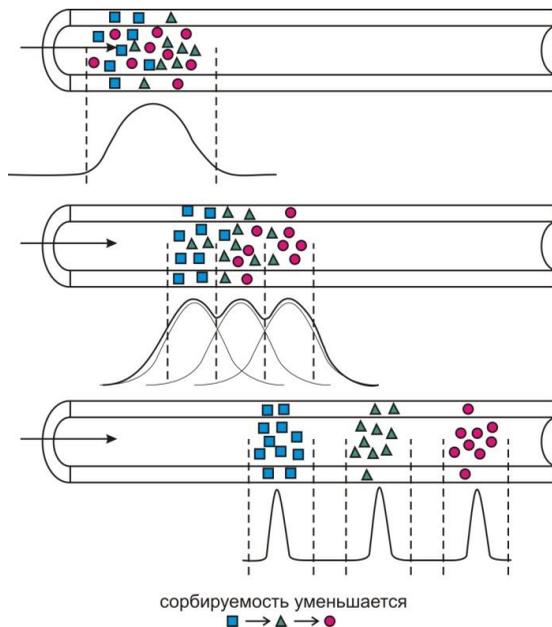


Рис. 2. Разделение компонентов смеси в хроматографической системе

По современной номенклатуре, предложенной ИЮПАК, хроматография рассматривается не только как процесс, но и как наука, изучающая этот процесс, а также метод разделения сложной смеси, основанный на этом процессе [3].

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

Хроматография – процесс дифференцированного многократного перераспределения веществ или частиц между несмешивающимися и движущимися относительно друг друга фазами, приводящий к обособлению концентрационных зон

индивидуальных компонентов исходных смесей этих веществ или частиц.

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

Наиболее широко в настоящее время хроматография используется как метод анализа. С ее помощью выполняется более 60 % наиболее востребованных на сегодняшний день качественных и количественных анализов.

ОТКРЫТИЕ И РАЗВИТИЕ ХРОМАТОГРАФИИ

Основоположителем хроматографического метода анализа является русский ученый Михаил Семенович Цвет, который детально разработал метод и применил его для разделения хлорофилла – красящего вещества зеленого листа – на составляющие компоненты.

М.С. Цвет родился в 1872 году в небольшом городке Асти на севере Италии. Мать М.С. Цвета, Мария де Дорочца – итальянка, отец, Семен Николаевич Цвет – высокопоставленный чиновник, родом из Чернигова.

Поскольку мать новорожденного вскоре умерла, отец оставил его на попечении кормилицы в Швейцарии. Детские годы он провел большей частью в Лозанне, куда его отец часто приезжал из России. В 1882–1885 гг. М. Цвет учился в колледже Гальярда в Лозанне, на площади Шадрон, а жил на вилле Монтбель в пансионе Роша-Лагнелей. Позднее М. Цвет поселился в Женеве. Здесь он учился в колледже Сант-Антуан, после окончания которого в 1891 г. поступил на физико-математический факультет Женевского университета.



М.С. Цвет.
Варшава, 1911 г.

После прохождения четырех семестров в 1893 г. М.С. Цвет сдал экзамены и получил степень бакалавра естественных наук, после чего продолжил учебу в том же университете. В круг его научных интересов входили биология, химия и физика. Особенно много времени он работал в лаборатории ботаники, где под руководством проф. Р. Шода провел свои первые исследования, которые в 1894 г. Женевским университетом были удостоены премии Х. Дэви. Затем М.С. Цвет перешел в лабораторию общей ботаники

проф. М. Тюри, где выполнил свою докторскую диссертацию «Исследование физиологии клеток», которую завершил к февралю 1896 г. Затем М.С. Цвет переехал Симферополь. Находясь в России, М.С. Цвет, желая продолжить свои исследования в области физиологии растений, пытается найти место в каком-либо учебном заведении.

В 1900 году по рекомендации видных ученых М.С. Цвет был принят в члены Петербургского общества естествоиспытателей. В это же время М.С. Цвет обращается в российские университеты с просьбой в порядке исключения принять у него магистерские экзамены. Наконец, руководство Казанского университета согласилось проэкзаменовать Цвета. В течение времени, немногим больше одного месяца, М.С. Цвет сдал четыре экзамена по различным разделам ботаники и химии (ноябрь 1899 г.), а 12 апреля 1901 г. представил к защите диссертацию «Физико-химическое строение хлорофиллового зерна». Осенью того же года М.С. Цвет блестяще защитил диссертацию и, получив степень магистра ботаники, выразил желание остаться в Казанском университете в качестве приват – доцента. Руководство поддержало просьбу М.С. Цвета, однако буквально через несколько дней он неожиданно уехал в Варшаву.

Здесь, в библиотеке Варшавского университета работала Елена Александровна Трусевич, которая в 1907 г. стала женой М.С. Цвета.

В этот первый период варшавской жизни успехи и удача сопутствовали молодому ученому. Опыты М.С. Цвета по разделению сложных смесей в заполненной мелом трубке не только положили начало разгадке тайны зеленого листа, но и стали основой нового метода разделения сложных смесей – хроматографии. И вот первый в Варшаве доклад молодого ученого «О новой категории адсорбционных явлений и применении их к биохимическо-

му анализу», который был заслушан 8 (21) марта 1903 г. в Биологическом отделении Варшавского общества естествоиспытателей.

В этой своей первой хроматографической работе М.С. Цвет впервые использовал наряду с фронтальным проявительный вариант хроматографии, описал применение в качестве адсорбентов более 100 различных веществ, впервые применил методику ступенчатого изменения свойств растворителя, установил, что речь идет о чисто физической адсорбции веществ. Единственно, чего не хватало в этой работе, – самого термина «хроматография», от чего, естественно, она не перестала быть первой работой по хроматографии.

В следующей работе, опубликованной через 3 года после доклада, М.С. Цвет ввел уже и сам термин «хроматография».

Первое заявление для зарубежных коллег о разработанном им аналитическом методе на основе адсорбции М.С. Цвет сделал в статье об изучении бурых водорослей, переданной в «Доклады Немецкого ботанического общества» 16 мая 1906 г. и выпущенной в том же году. В ней метод был лишь назван, но никак не описывался. Автор отсылал читателя к своему русскому сообщению 1903 г. в «Трудах Варшавского общества естествоиспытателей. Однако никто не обратил какого-либо внимания на это замечание Цвета, не было на него отсылок и в последующие годы.

Цвет заявил о своем методе западноевропейской науке двумя специальными статьями – «Физико-химическое исследование хлорофилла. Адсорбция» и «Адсорбционный анализ и хроматографический метод. Применение к химии хлорофилла», переданными в тот же журнал соответственно 21 июня и 21 июля 1906 г. и увидевшими свет в том же году. В названных двух немецких статьях и особенно в последней из них Цвет не только ознакомил зарубежных читателей с разработанным им методом, но и сообщил о результатах его совершенствования путем более эффективных адсорбентов, растворителей и приемов.

Изучение основной работы М. С. Цвета «Хромофиллы в растительном и животном мире», опубликованной в 1910 г., показывает, что ученый существенно развил предложенный им хроматографический метод. 28 ноября 1910 г. в Варшавском университете М.С. Цвет блестяще защитил русскую диссертацию на степень доктора ботаники.

В этот период М.С. Цвет настойчиво искал возможность занять специальную кафедру ботаники в Самарском или Новоалексеевском институтах или в Львовском университете. В одном из прошений в Министерство просвещения ученый писал: «Назначение на кафедру... дало бы мне возможность шире применить мои знания и шире же развернуть научную деятельность».

Но для дважды доктора ботаники – М.С. Цвета, широко известного в России и за рубежом, в Российской империи ни кафедры, ни лаборатории не нашлось. И это не могло не оказать отрицательного влияния на жизнь М. С. Цвета.

А когда началась первая мировая война, и пришлось срочно эвакуироваться из Варшавы все рукописи и рабочие журналы Цвета погибли. Наконец, в марте 1917 г. М.С. Цвет был избран профессором университета в Юрьеве (Тарту) и директором ботанического сада. Но проработать там удалось меньше года: он вновь должен был эвакуироваться, на сей раз в Воронеж, где в это время организовывался университет. В Воронеже он стал одним из первых профессоров Воронежского университета. И в Тарту, и в Воронеже состояние здоровья М.С. Цвета было очень неважным. По отзывам университетских врачей, М.С. Цвет страдал декомпенсированным пороком сердца. Умер он 26 июня 1919 г. в больнице и был похоронен на кладбище Алексеевского монастыря.

К сожалению, время от времени предпринимаются попытки преуменьшить роль М.С. Цвета в открытии хроматографии. По-видимому, наиболее достойным ответом на это являются справед-

ливые слова одного из энтузиастов и знатоков хроматографии Л. Цехмайстера, который пишет: «Очевидно, Цвет является истинным изобретателем хроматографии во всех ее важнейших аспектах». Один из известных женеvских ботаников Дерев в своей обширной статье о М.С. Цвете и хроматографии еще в 1943 г. писал, что М.С. Цвет за свое открытие достоин Нобелевской премии хотя бы потому, что значительная часть нобелевских лауреатов по химии не получила бы столь значительных результатов без открытой М.С. Цветом хроматографии.

М.С. Цвет своими работами вдохнул новое, более глубокое содержание в те адсорбционные методы, которые были известны до него. В частности, нынешнее широкое развитие хроматографии на бумаге является, в первую очередь, следствием распространения открытых М.С. Цветом общих закономерностей на случай адсорбционного разделения смеси на полосках бумаги.

Открытый М.С. Цветом хроматографический метод длительное время практически не использовался. Лишь после работы Э. Ледерера, Р. Куна и Винтерштайна (1931 г.) он занял по праву заслуженное место, после чего началась и продолжается пора расцвета хроматографии в ее все новых и новых вариантах, во все новых и новых областях применения.

Существенный вклад в развитие идей М.С. Цвета, в первую очередь в области фотосинтеза и хроматографии, внесли советские ученые, особенно в послевоенный период.

Однако вернемся к классическим опытам М.С. Цвета. Было известно, что различные пигменты по-разному извлекаются из растертых листьев растений: некоторые (каротин) хорошо растворяются в нефтяном лигроине, а другие (ксантофилл и хлорофилл) извлекаются (экстрагируются) только полярными растворителями, например спиртами. Цвет впервые правильно объяснил это явление тем, что пигменты находятся в хлорофилловых зернах в адсорбированном

состоянии и сила адсорбции у них различна. Поэтому каротин легко десорбируется и переходит в растворитель, а для выделения других пигментов нужно, чтобы спирт вытеснил их, так как сам он адсорбируется сильнее пигментов. Так нельзя ли использовать адсорбцию для разделения веществ? Цвет добавил к раствору (экстракту) пигментов порошок мела, и действительно, некоторые пигменты адсорбировались, а некоторые остались в растворе. Но разделение было неполным. На основании этого он пришел к выводу, что нужен не однократный, а многократный адсорбционный процесс. Вот тогда-то Цвет и проделал свой исторический опыт. В трубку с порошком мела он залил раствор пигментов. В верхней части образовалось окрашенное кольцо. Затем в трубку он стал непрерывно подавать бензол. Пигменты частично растворялись в нем, опускались, адсорбировались другими зернами мела, снова растворялись в новых порциях бензола и снова опускались по трубке. Но так как разные вещества по-разному извлекались бензолом из адсорбента, они опускались по трубке с разной скоростью. Поэтому первоначальное зеленое кольцо, опускаясь, постепенно расширялось и делилось на несколько разноцветных колец. В конце концов, этих колец оказалось шесть: верхнее желтое, затем оливково-зеленое, далее темно-зеленое и три желтых. Цвет извлек слой адсорбента из трубки, разрезал его на цилиндрики, в каждом из которых оказалось своё цветное кольцо (рис. 3). Теперь можно было извлечь вещества из адсорбента спиртом и исследовать. В результате Цвет показал, что хлорофилл – это не индивидуальное соединение, а смесь двух веществ, которые разделились на колонке и дали оливково-зеленое и темно-зеленое кольца. Остальные вещества были ксантофиллами. «Как лучи света в спектре, – отмечал Цвет, – в столбике углекислого кальция закономерно располагаются компоненты пигментов, давая возможность для своего качественного и количественного определения».

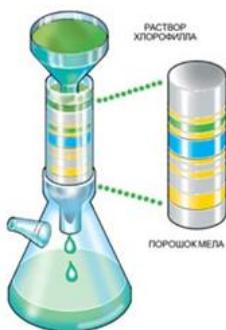


Рис. 3. Разделение хлорофилла на меле

Американский ученый Г. Стрейн писал, что Цвет разработал «остроумный» метод химического анализа, которому суждено оказать влияние на жизнь человечества и всего живого мира. Он позволяет осветить сложнейшие природные процессы, процессы питания, влияния гормонов на внешний вид и характер людей и животных. Благодаря этому методу в сложном механизме живой клетки обнаружены реакции, которые ранее невозможно было себе представить. Немецкий биолог Л. Цехмейстер отмечал, что «метод Цвета осуществил заветную мечту химика».

Цвет назвал получаемую при разделении веществ разноцветную картину хроматограммой, а сам метод хроматографическим адсорбционным анализом или хроматографией. Название было подобрано очень остроумно, если учесть, что слово «хроматография» в переводе с греческого означает «цветопись», то есть, с одной стороны, говорит о разделении окрашенных веществ, а с другой – напоминает об имени изобретателя метода. Конечно, дело не в том, что разделяемые вещества окрашены, автор сам указывал, что с равным успехом можно разделять и бесцветные соединения. Главное – это возможность разделения веществ по их склонности к адсорбции.

Цвет указывал: «Само собою, разумеется, описанные явления присущи не только хлорофилльным пигментам: ясно, что самые разнообразные окрашенные или бесцветные химические соединения подчиняются тем же закономерностям».

Процесс перемещения разделяемых веществ в потоке растворителя Цвет назвал проявлением хроматограммы. И по сей день этот вариант хроматографии называют проявительным или элюционным анализом. Сейчас, когда разработаны разнообразные хроматографические методы, мы, пользуясь современной классификацией их, можем сказать, что Цвет впервые использовал проявительный вариант жидкостно-адсорбционной хроматографии. Проявителем, подвижной фазой служила жидкость, а неподвижной, сорбирующей фазой – твердый адсорбент.

К сожалению, судьба хроматографии оказалась похожа на судьбу многих открытий и изобретений, особенно тех, которые опередили свое время. Сначала открытие не признается, о нем говорят как об ошибке, как о том, чего «не может быть, потому что не может быть никогда», потом проходит время и постепенно открытие «входит в обиход», становится «само собой разумеющимся», но... предлагают изменить его название. А дальше оказывается, что у автора было много предшественников и он, собственно, ничего не открыл и не изобрел. Если к этому времени автор еще жив, он постоит за свой приоритет. А если нет? Всегда ли потомки оказываются справедливы? Всегда ли они увенчивают лаврами именно того, кто этого заслужил? Да и вообще, как правильно определить автора? Ведь почти всегда имеются предшественники, всегда, чтобы посмотреть дальше, надо, как говорил Ньютон, «встать на плечи гигантов».

Еще при жизни Цвета ряд крупных ученых выступило против его метода. Среди противников хроматографии были и немецкий биолог Р. Вильштеттер и К.А. Тимирязев – крупнейшие ученые,

чей вклад в развитие науки трудно переоценить. Вильштеттер сам выполнил прекрасную работу по исследованию хлорофилла, получив предварительно продукты реакции его с кислотой и щелочью.

Какие же возражения были выдвинуты против хроматографического метода анализа? Дело в том, что Цвет, как биолог, проводил свои опыты с веществами, которые не очень устойчивы и могут разлагаться, вступать в химические реакции. Критики метода полагали, что разделяемые вещества, адсорбируясь, могут изменять свое строение. Таким образом, это были возражения не против метода, а против его применения к конкретным объектам. Если бы Цвет разделял смеси более простых по строению и устойчивых веществ, например углеводов, возражения отпали бы сами собой. А сейчас надо доказывать большее, доказывать, что ни одно из выделенных веществ не изменилось. Для этого нужны время, условия и силы. И тем больше оказалась заслуга Цвета, тем ярче засияли его идеи, когда выяснилось, что все возражения противников несостоятельны, что все результаты и даже предсказания подтвердились, когда метод получил всеобщее признание и развитие. Но это произошло потом, спустя много лет после смерти Цвета.

Мы должны исходить из тех позиций, что истинным автором открытия или изобретения достоин считаться тот, кто впервые построил прочный фундамент, на котором последующие поколения ученых воздвигнут здание, а не те кто, может быть и раньше, но заложили лишь отдельные кирпичики. А так как здание будет расти не только ввысь, но и вширь, то расширенный фундамент может вбирать в себя и рядом лежащие более старые кирпичики и блоки. Д.И. Менделеев писал: «Научные открытия редко делаются сразу... время вызывает действительного творца, обладающего всеми средствами для проведения истины во всеобщее сознание; однако не должно забывать, что он может являться только благодаря труду многих и накопившейся сумме данных».

Со времени опубликования в 1910 году книги М.С. Цвета «Хромофиллы в растительном и животном мире» очень немногие из химиков использовали хроматографический метод. Долгое время он оставался малоизвестным, но в 1913 году Л. Пальмер и Экклес использовали этот метод для разделения ограниченного числа пигментов из растворов для спектральных исследований. Л. Пальмером была написана книга «Каротиноиды и пигменты». Впоследствии в 1931 г. группе немецких ученых из Института фундаментальной медицины Р. Куну, А. Винтерштейну и Э. Ледереру удалось выделить хроматографическим методом α - и β -каротин из сырого каротина, что дало толчок к дальнейшему развитию хроматографии и ее широкому использованию в ботанических и биохимических лабораториях.



Р. Кун

Рихард Кун (R. Kuhn)

Австрийский химик Рихард Кун родился в Вене. После окончания гимназии Р. Кун поступил в Венский университет, но вскоре перешел в университет в Мюнхене. Там он изучал химию у Рихарда Вильштеттера – лауреата Нобелевской премии «за исследования красящих веществ растительного мира, особенно хлорофилла» (1915 г.) и в 1922 г. получил докторскую степень. За свои исследования, главным образом, хлорофиллов Вильштеттер получил в 1915 году Нобелевскую премию по химии. Вильштеттер был одержим диссертацией Цвета по хлорофиллам (и хроматографии), переведенной на немецкий язык и изданной в виде книги, и читал ее Куну и его сотрудникам. Р. Кун продолжал заниматься исследованиями в Мюнхенском университете, пока в 1926 г. не перешел в Федеральный технологический институт в Цюрихе. Кун занялся

изучением каротиноидов – биологических пигментов, являющихся важной составной частью живых клеток. В 1931 г. независимо друг от друга Кун и Пауль Каррер обнаружили в каротине два четко отличающиеся друг от друга компонента: альфа-каротин и бета-каротин. Позже Р. Кун открыл третий вид – гамма-каротин. Продолжая исследования, Р. Кун выяснил, что каротин является исходным веществом витамина А, т.е. необходимым «стартовым материалом» для производства этого витамина биологическими системами. Р. Кун и его сотрудники открыли присутствие каротиноидов в организмах многих растений и животных, тем самым значительно расширив возможности использования такого важного аналитического инструмента, как хроматография. В 1939 г. Р. Куну была присуждена Нобелевская премия по химии за 1938 г. «в знак признания проделанной им работы по каротиноидам и витаминам».

Эдгар Ледерер (E. Lederer)

Эдгар Ледерер родился в 1908 г., в Вене, Австрия. Окончил Венский университет, где в 1930 г. получил степень доктора. Начал работать в Гейдельберге под руководством Р. Куна. В 1935–1937 г.г. был директором института витаминов в Ленинграде. В 1938 г. вернулся во Францию. С 1954 г. в Сорбоннском университете, затем с 1960 г. директор института химии природных веществ Национально-



Э. Ледерер

го Центра научных исследований в Жив-сюр-Иветте. Был кавалером ордена Почетного легиона, почетным доктором 2-х университетов, членом 6 академий, получил 7 медалей за научные достижения. В историю хроматографии Э. Ледерер вошел как ученый, блестяще подтвердивший результаты М.С. Цвета после пери-

ода, когда метод использовали сравнительно мало. Прибыв в лабораторию Р. Куна и получив от него задачу – исследовать, содержатся ли ксантофиллы и зооксантины в лютеине куриного яйца, – Э. Ледерер вспомнил, что в книге Пальмера о каротиноидах упоминаются работы М.С. Цвета. Э. Ледерер тщательно ознакомился с переводом основной книги М.С. Цвета, и в декабре 1930 г. был получен ксантофилл и зооксантин. Далее были продолжены эксперименты с каротинами моркови, и снова успешное разделение. Публикацию этих результатов принято рассматривать как очень важный этап в широком использовании хроматографии.

После возрождения хроматографии, в тридцатых годах, наряду с широким использованием того варианта, который был предложен Цветом и признан классическим, – проявительного варианта жидкостно-адсорбционной хроматографии, и его усовершенствованием стали возникать и развиваться новые варианты метода. Прежде всего, был устранен существенный недостаток классического варианта. Дело в том, что Цвет получал хроматограмму на слое сорбента, поэтому для выделения разделенных веществ ему приходилось извлекать адсорбент из колонки и экстрагировать вещества. Таким образом, перед каждым анализом колонку нужно было заново заполнять адсорбентом. Японский ученый В. Кошара, в отличие от Цвета, после проявления зон на сорбенте продолжал подачу проявителя до тех пор, пока все разделенные вещества не выходили поочередно из колонки. Так была получена жидкая хроматограмма, или хроматограмма в элюате (в потоке, выходящем из колонки). Преимущества этого способа очевидны: во-первых, в руках у исследователя оказываются растворы каждого из разделенных веществ в проявителе, во-вторых, после окончания одного анализа в колонку можно сразу (или, если это необходимо, после отдувки растворителя воздухом) вводить следующую пробу.

Одновременно хроматография развивалась и в других направлениях. Так, были разработаны бумажная и тонкослойная хроматография. Первое упоминание об этих методах содержится в работе советских ученых Н.А. Измайлова и М.С. Шрайбер (Харьковский химико-фармацевтический институт) «Капельные хроматографические методы анализа и их использование в фармакологии», опубликованной в 1938 г. Особенность проведения эксперимента заключалась в том, что сорбент, на котором проводили разделение, находился не в колонке, а был нанесен тонким слоем (2 мм) на стеклянную пластину. Слой готовили из пасты, состоящей из оксида алюминия, оксида магния или кальция и воды. Каплю исследуемого раствора (спиртового экстракта лекарственного растения) помещали на адсорбент и элюировали, постепенно нанося капли растворителя (спирта) в центр пятна. Хроматограмма при этом имела вид концентрических зон. Авторы сравнили затем полученные ими кольцевые хроматограммы с соответствующими колоночными хроматограммами (рис. 4) и указали на преимущество их нового метода.

Работа русских исследователей заканчивается следующим выводом: «Разработан метод хроматографического адсорбционного анализа, основанный на разделении веществ в тонком слое адсорбента на зоны, при применении одной капли вещества. Результаты, полученные предложенным методом, качественно совпадают с результатами, полученными обычным методом адсорбционной хроматографии. Метод позволяет получить удовлетворительные результаты при затрате одной капли исследуемого вещества, очень небольших количеств адсорбента и за минимальное время. Метод можно использовать для анализа фармацевтических препаратов и их идентификации, а также для предварительной оценки сорбента и растворителя. Новым методом было изучено 16 фармацевтических препаратов».

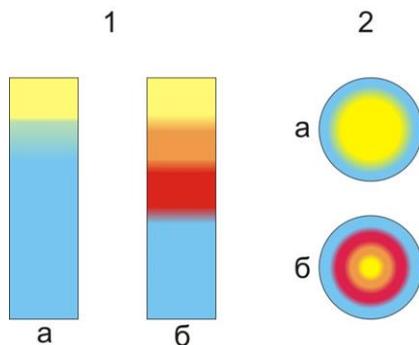


Рис. 4. Сравнение окраски флуоресценции настойки белладонны, полученной методом колоночной хроматографии на оксиде алюминия (1) и методом тонкослойной хроматографии (2) перед проявлением (а) и после проявления (б) этиловым спиртом [5])

В 1940 г. шведский ученый А. Тиселиус разработал фронтальный и вытеснительный методы хроматографического анализа. С фронтальным вариантом мы уже познакомились; он отличается тем, что исследуемая смесь подается в колонку непрерывно. Этот метод наиболее близок к природным хроматографическим процессам.

Вытеснительный метод основан на том, что более сильно адсорбирующееся вещество вытесняет с поверхности адсорбента слабо адсорбирующееся и занимает его место. Поэтому после введения в колонку определенного количества анализируемой пробы начинают подавать вытеснитель – жидкость, адсорбирующуюся сильнее всех компонентов смеси. Тогда зоны компонентов распределяются на слое по степени адсорбируемости и каждое последующее вещество, вытесняя предыдущее, протолкнет его вперед. Такой метод позволяет сконцентрировать компоненты на слое адсорбента и поэтому удобен, в частности, при определении примесей. Однако в общем случае он никак не может конкурировать с проявительным вариантом.

Арне Тиселиус (A. Tiselius)

Шведский биохимик Арне Вильгельм Каурин Тиселиус родился в Стокгольме. В 1921 г. Тиселиус поступил в Упсальский университет и в 1925 г. получил магистерскую степень.

А. Тиселиус занимался исследованием электрофореза. А затем он обратил внимание на другой метод разделения – хроматографию.

А. Тиселиус сумел доказать, что сывортка белка, известная как глобулин, фактически состоит из трех видов, которые он назвал альфа-, бета- и гамма-глобулином.

А. Тиселиус распространил хроматографию на разделение бесцветных веществ. А. Тиселиус изучил много вариантов хроматографии, включая использование элюата, адсорбируемого в целом сильнее, чем любое из разделяемых веществ. Эту технологию он назвал вытеснительным анализом.

В 1948 г. А. Тиселиусу была присуждена Нобелевская премия по химии «За исследование электрофореза и адсорбционного анализа, особенно за открытие, связанное с комплексной природой белков сывортки». А. Тиселиус, установив, что глобулин не является гомогенным веществом, заложил основы научно-исследовательской работы, направленной на разделение плазмы крови человека на составные части.

Хроматографический метод был подхвачен другими учеными. В частности, когда в 1933 году Винтерштайн из группы Куна посетил «Лабораторию пищевой химии Данна» в университете Кембриджа и продемонстрировал хроматографическое разделение каротиноидов, ему ассистировал двадцатитрехлетний инженер-химик Арчер Портер Мартин. Он был направлен в эту лаборато-



А. Тиселиус

рию, занимавшуюся проблемами питания, чтобы обнаружить витамин Е (токоферол). Год спустя Мартин приступил к собственным исследованиям по хроматографии.

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

Ричард Лоуренс Миллингтон Синг получил стипендию на определение аминокислотной последовательности шерстяного волокна от Международного фонда шерстяной промышленности. А. Мартин помог ему сконструировать противоточный экстрактор с использованием воды и хлороформа. Целью работы было разделить смесь олигопептидов, которые образуются при разрушении протеинов волокна, на составные части, которые можно идентифицировать с тем, чтобы по ним установить исходную последовательность протеинов.

В 1940 году Мартин вернулся в Лидс в научную лабораторию британской шерстяной промышленности, и Синг, после короткого размышления, последовал за ним, прихватив новую аппаратуру. Позже Синг писал: «Пока наша противоточная распределяющая машина работала, мы делили динитрофенилгидразоны альдегидов хроматографически на оксиде магния. Неудовлетворенные работой с хлороформно-водным экстрактором, мы подумали о том, нельзя ли его изменить таким образом, чтобы иметь только одну движущуюся фазу и чтобы при этом проба вводилась в точке подачи подвижной фазы, как при хроматографии».

В результате решения задачи разделения аминокислот и их производных Мартином и Сингом были разработаны принципы распределительной хроматографии: они закрепляли одну из фаз

(неподвижную фазу) на носителе, например, порошкообразном силикагеле, и затем заполняли им колонку. В качестве «растворителя», называемого в данном случае подвижной фазой, использовали хлороформ с добавкой этанола. Комплексы с метилоранжем в качестве индикатора позволяли наблюдать перемещение аминокислот по стеклянной колонке.

Арчер Джон Портер Мартин
(A. J. P. Martin)

Арчер Джон Портер Мартин родился в 1910 г. в Лондоне, окончил Кембриджский университет и получил степень доктора в 1936 г. В 1938-1946 г.г. работал в Ассоциации производства шерсти, затем в Совете по медицинским исследованиям до 1956 г. затем консультантом многих компаний, в 1964-1974 г.г. в Эйндховене (Голландия). Лауреат Нобелевской премии по химии 1952 г. за открытие распределительной хроматографии. Командор Британской империи, награжден рядом медалей и орденом Восходящего Солнца.



А. Мартин

С Р. Сингом познакомился в 1937 г. и они вместе стали заниматься выделением кислот из шерсти. А. Мартин осуществил впервые двухмерную проявительную хроматографию, которая была использована для разделения пептидов. А. Мартин разработал теорию движения зон, связав скорость их перемещения с коэффициентами распределения, а применив теорию эквивалентных теоретических тарелок, описал законы их размывания.

А. Мартин и А. Джеймс осуществили вариант газовой распределительной хроматографии и разработали метод газожидкостной хроматографии. Этот метод оказался особенно полезным

для характеристики жирных кислот и смесей стероидов, имеющих в микрограммовых количествах.



Р. Синг

Ричард Лоуренс Миллингстоун Синг (R. L. M. Syngе)

Ричард Лоуренс Миллингстоун Синг родился в 1914 г. в Ливерпуле, Англия. Окончил Тринити-колледж Кембриджского университета. Степень доктора Кембриджского университета получил в 1941 г. Работал в Промышленной Кампании по шерсти, в Институте превентивной медицины и институте исследования пищевых продуктов. Основной круг интересов – биохимия и анализ пептидов. В 1952 г. вместе с А. Мартином получил Нобелевскую премию «за открытие распределительной хроматографии».

В 1941 г. А. Мартин и Р. Синг решили применить принцип противоточного распределения к методу хроматографии. Подход был назван распределительной хроматографией, так как в нем использовались и хроматография, и распределение растворенного вещества между двумя растворителями.

Получив в 1943 г. докторскую степень, Р. Синг вошел в штат Листеровского института профилактической медицины в Лондоне в качестве биохимика. Занимаясь анализом пептидных антибиотиков, он продолжал в то же время сотрудничать с А. Мартином в совершенствовании метода распределительной хроматографии.

А. Мартин и Р. Синг в 1944 г. разработали метод бумажной хроматографии, при котором в качестве носителя применяется фильтровальная бумага.

В 1941 г. А. Мартин и Р. Синг продемонстрировали возможности распределительного варианта хроматографии и показали, что

разделение веществ происходит в результате их распределения между двумя фазами растворителей [6]. Было установлено, что в основе разделения веществ методом распределительной хроматографии лежит закон распределения, а не адсорбционные явления, как в случае Цветовой хроматографии. Действительно, если имеем две жидкие, не смешивающиеся друг с другом фазы (например, вода-толуол, вода-бензол), и в одну из фаз ввести исследуемое соединение и тщательно перемешать фазы, то через некоторое время устанавливается равновесие распределения исследуемого соединения между фазами, которое описывается законом распределения. Теперь, если одну из фаз этой системы сделать неподвижной (например, закрепить на твердом носителе), заполнить этой фазой колонку и пропускать через колонку другую, не смешивающуюся с первой фазу, то при вводе в колонку смеси веществ они будут распределяться между фазами в соответствии с величинами коэффициентов распределения исследуемых соединений в данной системе фаз.

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

Уже в 1941 году Мартин и Синг заметили, что подвижная фаза также может быть и паром: «Разделенные летучие вещества должны быть возможными в колонке, в которой перманентный газ протекает над гелем, пропитанным нелетучим растворителем, пропитанным нелетучей жидкостью, причем разделяемые вещества приближенно подчиняются закону Рауля». Однако первые газовые хроматографы были сконструированы только в 50-е годы, причем снова путеводителем в этом процессе служила совместная статья А.Дж. П.Мартина и А.Т. Джеймса. Мартин и Джеймс использовали для своих первых газовых хроматографов силиконовое масло (с 10%-ной стеариновой кислотой, нанесенной на силикагель в качестве стационарной фазы). Газом-носителем был азот, пробу наносили с пипетки, прошедшие колонку фракции улавливали в воду и определяли титрованием. Первые коммерческие газовые хроматографы были оснащены детекторами по теплопроводности (катарометрами), пробы вводили через специальную прокладку, и с 1950-х годов начинается интенсивное развитие хроматографического приборостроения.



А.Т. Джеймс

Антони Траффорд Джеймс (A. T. James)

Антони Траффорд Джеймс родился в 1922 г. в Кантоне, Южный Уэльс, Англия. Окончил Северный Политехнический институт в Лондоне. Докторскую степень получил в 1946 г., работая в Национальном институте медицинских исследований. Получил 5 медалей за научные успехи в разных областях.

Работая под руководством А. Мартина, с 1950 г. занялся вместе с ним распределительной газовой хроматографией. Разработал и использовал ряд детекторов для газо-

вой и жидкостной хроматографии, провел серию работ по использованию хроматографии в биохимии. Используя сначала противоточную кристаллизацию, они перешли к использованию длинной заполненной цеолитом, трубки для разделения жирных кислот, нанеся на цеолит нелетучие жирные кислоты (1951 г.). Метод был распространен на летучие водорастворимые компоненты с детектированием ионов. Далее, были обозначены параметры газожидкостной хроматографии, дана теория на основе концепции теоретических тарелок. В 1956 г. на основе этих разработок был создан хроматограф. После ухода А. Мартина из Медицинского института А. Джеймс занимался хроматографией липидов, с целью идентификации были использованы данные по удерживанию на двух разных фазах. Им был разработан радиохимический детектор.

Широкое распространение получила ионообменная хроматография, основанная на обратимой химической реакции – обмене катионами или анионами между анализируемыми веществами и адсорбентом. Способность к такому обмену у различных веществ различна, поэтому-то по мере проявления смеси на колонке и происходит разделение. Здесь, как и в адсорбционной хроматографии, используются фронтальный и проявительный методы.

Специальные ионообменные сорбенты (сульфированный уголь, соответствующим образом обработанная окись алюминия, синтетические ионообменные смолы) применяют с целью опреснения питьевой воды, очистки воды для паровых котлов и ядерных реакторов, а также в различных областях пищевой и химической промышленности. Ионообменная хроматография широко используется в аналитической и препаративной химии, в частности, для разделения щелочных, редкоземельных и трансурановых элементов. Известно, например, что этот метод использован учеными, занимавшимися во время войны созданием атомной бомбы («Манхэттенский проект»), а также в последующие годы – специалиста-

ми, работающими в области синтеза новых элементов и получения ядерной энергии. Поскольку разделяемые и анализируемые вещества радиоактивны, в качестве детектора применяют счетчик радиоактивности. При этом на хроматограмме получаются сигналы даже тогда, когда в смеси содержится всего несколько атомов того или иного элемента. Таким образом, был идентифицирован элемент № 101 – менделев (Md).

Исключительное значение для развития хроматографии имело создание в 1956 году М. Голеем варианта высокоэффективной капиллярной газовой хроматографии. В 1957 году на Симпозиуме по газовой хроматографии (Лансинг, США) он представил свое теоретическое исследование поведения паров образца, введенных в трубку, по которой постоянно протекает газ, а на симпозиуме в Амстердаме сообщил о результате экспериментальной проверки сделанных им теоретических выводов [7]. В 1960 г. он писал: «... почему не сделать полузаполненную колонку с большим открытым центральным каналом, составляющим, например, 0,9 диаметра колонки, и с тонким слоем насадки в оставшейся части по периферии? ... Я убежден, что такие колонки являются почти идеальными колонками, позволяющими проводить более разнообразные анализы, чем применяемые в настоящее время трубчатые колонки с гладкими стенками...»

В 1962 году М. Порат и Д. Флодин создали вариант ситовой (эксклюзионной) хроматографии и применили его для разделения высокомолекулярных соединений.

С середины 70-х годов начинается период интенсивного развития жидкостной хроматографии. Первоначально хроматография была предложена в виде колоночного жидкостно-адсорбционного метода. В этом методе использовались адсорбенты с размером зерен более 50–100 мкм, элюент проходил через колонку самотеком за счет силы тяжести, проточных детекторов не было. Разделение

происходило медленно, в течение нескольких часов, и в таком режиме жидкостная хроматография не могла быть использована для аналитических целей. В 1965–1970 гг. усилия специалистов в различных странах были направлены на создание экспрессной жидкостной хроматографии. Было ясно, что для увеличения скорости разделения нужно сократить пути внешней и внутренней диффузии. Этого можно было добиться за счет уменьшения диаметра зерен адсорбентов. Заполнение колонок мелкими зернами (5 – 10 мкм) создавало большое входное давление, что потребовало применения насосов высокого давления. Так появилась жидкостная хроматография высокого давления. При переходе к адсорбентам мелкой фракции сильно возросла эффективность колонок (в расчете на единицу длины в сотни раз выше эффективности колонок в газовой хроматографии), поэтому современную экспрессную аналитическую жидкостную хроматографию назвали высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) [8].

Марсель Юлий Эдуард Голей
(M. J. E. Golay)

Марсель Юлий Эдуард Голей родился в 1902 г. в Невшателе, Швейцария. Окончил Техническую высшую школу в Цюрихе. В 1931 г. получил степень доктора по атомной физике в Чикаго. За свою многолетнюю творческую жизнь достиг успехов в разных областях и получил 4 научных медали.



М Ю.Э. Голей

Его интерес к газовой хроматографии возник в 1955 г. с теоретической оценки возможности использования полых колонок, исследования влияния различных параметров на эффективность колонок, включая способ введения и объем вводимой пробы. Эти труды оказали

влияние на работы по повышению эффективности хроматографических колонок, в том числе и для препаративной хроматографии.

В 1957 году М. Голей предложил использовать в качестве колонок длинные капилляры, что значительно повысило эффективность разделения. Использование капилляров дало возможность проводить детальный анализ смесей, включающих десятки и сотни компонентов. Таким образом, М. Голей создал вариант капиллярной хроматографии. Приблизительно в это же время были изобретены высокочувствительные пламенно-ионизационный и ионизационный детекторы, что в итоге обеспечило следующий качественный скачок в развитии газовой хроматографии.

Хроматография оказала огромное влияние на развитие науки. Более десятка крупных работ, удостоенных Нобелевской премии, так или иначе, связаны с хроматографией.

Например в 1958 г. Нобелевская премия была присуждена Ф. Сенгеру по химии «за установление структур белков, особенно инсулина». Он доказал, что белок может быть расщеплен на составляющие его аминокислоты с разрушением пептидных связей, а для разделения и идентификации аминокислот использовалась хроматография.

В 1972 г. У. Стайну и С. Муру была присуждена половина Нобелевской премии по химии «за их вклад в прояснение связи между химической структурой и каталитическим действием активного центра молекулы рибонуклеазы». Для получения высокочистых образцов фермента рибонуклеазы использовалась ионообменная хроматография.

В 2002 г. К. Танака стал Нобелевским лауреатом, разделив половину премии с Дж. Фенном, «за развитие методов идентификации и структурного анализа биологических макромолекул: за развитие методов мягкой десорбционной ионизации для масс-спектрального анализа биологических макромолекул». В настоя-

щее время тандем хроматографии и масс-спектрометрии является неотъемлемым инструментом при анализе объектов окружающей среды, биоматериала для ранней диагностики соединений, в криминалистической химии, при допинговом контроле и т.д.

В СССР с 1953 года стала официально функционировать Комиссия по хроматографии при Академии наук СССР, которая впоследствии была реорганизована в Научный совет по хроматографии. Существенный вклад в создание и развитие отечественной хроматографической школы внесли:

А.А. Жуховицкий – хроматография вакантная, ступенчатая, итерационная и дифференциальная хроматография, хромадистилляция;

А.В. Киселев – развитие газо-адсорбционной хроматографии, хроматоскопия;

К.В. Чмутов – фундаментальные исследования равновесия, динамики и кинетики сорбции хроматографии, препаративная хроматография;

Я.И. Яшин – развитие газо-адсорбционной хроматографии, хроматографическое приборостроение;

Л.Н. Москвин, А.И. Горшков, М.Ф. Гумеров – жидкостно-газовая хроматография;

В.Г. Березкин – развитие газо-адсорбционной хроматографии, реакционная хроматография;

И.А. Ревельский – газовая хромато-масс-спектрометрия для анализа примесей;

Б.В. Иоффе, А.Г. Витенберг, Б.В. Столяров – развитие газовой экстракции;

М.С. Вигдергауз, Л.А. Онучак – мезофазная хроматография;

И.Г. Зенкевич – идентификация по индексам удерживания;

Д.А. Вяхирев – разработка новых принципов и методов газовой хроматографии и внедрение их в промышленность, препаративная хроматография;

В.А. Даванков – новый принцип разделения энантиомеров – лигандообменная хроматография на хиральных комплексообразующих сорбентах. Предложен принцип синтеза сверхсшитых полимеров стирола, на базе которых создана серия нейтральных полимерных сорбентов нового поколения;

К.И. Сакодынский – развитие хроматографического приборостроения, труды по адсорбции и газовой хроматографии.

Кроме того, следует отметить немалый вклад в развитие хроматографической науки и приборостроения Научного совета по аналитической химии и персонально академика РАН Золотова Ю.А. и члена-корреспондента РАН Шпигуна О.А.

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Наиболее широко в настоящее время хроматография используется как метод анализа. С ее помощью выполняется более 60 % наиболее востребованных на сегодняшний день качественных и количественных анализов. С этой точки зрения проведенный хроматографический процесс должен ответить на два вопроса: «Какое вещество находится в смеси?» (качественный анализ) и «Сколько этого вещества в смеси?» (количественный анализ).

Ответ на первый вопрос мы получим, если воспользуемся характеристиками удерживания, на второй – откликом детектора на количество вещества. Обе эти характеристики мы найдем на хроматограмме (рис. 5 и 6).

Хроматограмма – записанная во времени функция концентрации определяемых веществ в подвижной фазе на выходе из колонки

Как мы уже знаем, разделение в хроматографии основано на различной сорбируемости анализируемых соединений при движении их по слою сорбента в колонке. Если соединение не сорбируется, то оно не удерживается сорбентом в колонке и будет выходить из колонки со скоростью потока газа-носителя. Если же вещества сорбируются, то они удержатся в колонке, что будет определяться их сорбционной способностью: чем сильнее сорбция соединения, тем дольше оно будет удерживаться в колонке. Параметры удерживания, по существу, характеризуют сорбционную способность анализируемых соединений. Различие в сорбируемости в конечном итоге определяется различием межмолекулярных взаимодействий *вещество – сорбент*.

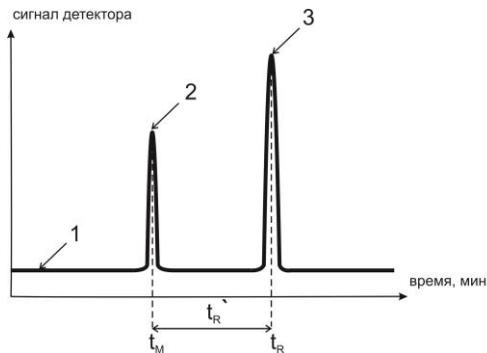


Рис. 5. Хроматограмма:

- 1 – нулевая линия, 2 – пик несорбирующегося вещества,
3 – пик исследуемого вещества (сорбата)

Нулевая линия представляет собой сигнал детектора при концентрации сорбата в подвижной фазе, равной нулю. Время от момента ввода пробы в колонку до выхода максимума пика называется *временем удерживания* t_R . Оно складывается из двух составляющих: времени нахождения молекул соединения в газовой фазе и времени нахождения молекул соединения в сорбируемом состоянии. Время нахождения молекул исследуемого соединения в газовой фазе оценивают с помощью величины *времени удерживания несорбирующегося вещества* t_M (мертвое время удерживания), которое зависит от доли пустот в насадочной или капиллярной колонке. В разных насадочных колонках плотность набивки может изменяться, будет также изменяться и величина t_M , поэтому для характеристики истинной удерживающей способности необходимо определять величину t'_R – *приведенное время удерживания*:

$$t'_R = t_R - t_M.$$

Величину t_M определяют по времени выхода несорбируемого соединения. В газовой хроматографии эту величину определяют по времени выхода гелия или водорода в случае применения детектора по теплопроводности и метана при использовании пламенно-ионизационного детектора.

Описанное выше время удерживания называют абсолютной характеристикой. Различают также относительные и интерполяционные величины удерживания.

Относительные величины удерживания рассчитываются относительно какого-либо вещества, взятого в качестве стандарта:

$$r = \frac{t'_{R_i}}{t'_{R_{st}}}$$

Точность определения относительных величин удерживания выше, чем абсолютных и не зависит от погрешности измерения скорости ПФ и количества НФ. Однако имеет место потеря информации об абсолютной величине удерживания.

Интерполяционные величины удерживания получают с использованием двух или более стандартных веществ сравнения, потому их точность выше, чем относительных. Логарифмический индекс удерживания Ковача (1958 г.) – это безразмерный параметр, характеризующий удерживание сорбата в масштабе шкалы удерживания n -алканов, хроматографируемых в идентичных изотермических условиях:

$$I = 100 \left(\frac{\lg t'_{R_x} - \lg t'_{R_z}}{\lg t'_{R_{(z+1)}} - \lg t'_{R_z}} + z \right),$$

где z и $(z+1)$ – число атомов углерода в молекулах n -алканов, элюирующихся до и после исследуемого вещества x , т.е. $t_{R_{(z+1)}} > t_{R_x} > t_{R_z}$. I – безразмерная величина, равная умноженному на сто числу атомов углерода в молекуле такого гипотетического n -

алкана, который имел бы одинаковое с исследуемым веществом приведенное время удерживания.

Линейный индекс удерживания, предложенный М.С. Вигдергаузом (1968 г.), определяется следующим соотношением:

$$J = \frac{t_{R_x} - t_{R_z}}{t_{R_{(z+1)}} - t_{R_z}} + z.$$

Он предложил более простое выражение, чем I , т.к. отсутствует необходимость определения t_M и логарифма приведенного времени удерживания t'_R . J – безразмерная величина, равная числу атомов углерода такого гипотетического n -алкана, который имел бы одинаковое с исследуемым веществом время удерживания.

Для определения количественного содержания анализируемого компонента в пробе используют следующие хроматографические сигналы:

h – высота пика (перпендикуляр, опущенный из максимума пика на продолжение нулевой линии);

Q – площадь пика, ограниченная его контуром и продолжением нулевой линии (рис. 6).

Площадь пика либо интегрируется при помощи специализированных программ, либо при использовании регистратора аналогового сигнала определяется оператором по площади треугольника как произведение высоты пика h на ширину пика на половине высоты w_h . Поэтому в идеальном случае строятся касательные по фронту и тылу пика.

Пик ограничивается фронтом, соответствующим возрастанию концентрации до максимальной и тылом, отвечающим убыванию концентрации сорбата в подвижной фазе. Расширение (размытие) полосы по мере элюирования характеризуется шириной пика: w_h – расстояние между точками пика на середине высоты; w_b – отрезок основания пика, отсекаемый двумя касательными в точках перегиба пика.

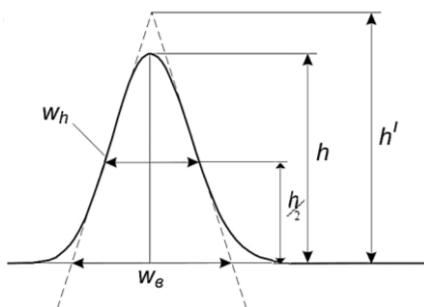


Рис. 6. Параметры
хроматографического
пика

Высота и площадь хроматографического пика являются количественной интерпретацией отклика детектора на содержание вещества в подвижной фазе, выходящей из колонки. Причем, чем больше концентрация анализируемого вещества, тем больше величина высоты или площади пика. Поскольку чувствительность детектора меняется в зависимости от соединения, для проведения количественного анализа предварительно строят градуировочные зависимости, которые отражают зависимость сигнала детектора (высоты или площади пика) от концентрации или массы определяемого вещества. В большинстве случаев зависимость имеет вид:

$$Q = K \cdot C ,$$

где Q – площадь пика определяемого компонента; C – концентрация определяемого компонента в анализируемой смеси; K – градуировочный коэффициент (коэффициент чувствительности детектора к определяемому компоненту).

Градуировочный коэффициент находят, хроматографируя ряд смесей с известным содержанием определяемого компонента (градуировочных смесей или растворов).

Проведение качественного и количественного анализа, в том числе построение градуировочной характеристики, описывается в

методиках выполнения хроматографических измерений, которые проходят соответствующую аттестацию.

В настоящее время существует большое количество хроматографических методов, краткая классификация которых представлена в табл. 1-4.

Таблица 1. Классификация хроматографических методов по цели проведения процесса

Название метода	Цель проведения процесса
Аналитическая хроматография	качественный анализ смеси и/или количественное определение отдельных компонентов смеси
Препаративная хроматография	используется для выделения чистых компонентов или фракций из смеси
Исследовательская (обращенная газовая или обращенная ситовая) хроматография	исследование структуры и свойств неподвижной фазы или пористой структуры сорбента

Таблица 2. Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз хроматографической системы

Подвижная фаза	Название метода	Неподвижная фаза	Название метода
Газ или пар	Газовая хроматография	жидкость, нанесенная на твердый носитель или на стенки колонки	газо-жидкостная хроматография
		твердый адсорбент	газо-адсорбционная хроматография
		жидкие кристаллы (мезофаза)	газо-мезофазная хроматография

Подвижная фаза	Название метода	Неподвижная фаза	Название метода
Жидкость	жидкостная хроматография	жидкость, нанесенная на твердый носитель или на стенки колонки	жидкостно-жидкостная хроматография
		твердый адсорбент	жидкостно-адсорбционная хроматография
Вещество в сверхкритическом (или субкритическом) состоянии (флюид)	сверхкритическая флюидная хроматография		

Таблица 3. Классификация хроматографических методов по способу перемещения сорбатов

Название метода	Описание метода	Вид хроматограммы [9]
Проявительная (элюентная) хроматография	смесь веществ А+Б+В периодически вводится в поток подвижной фазы (Д) и разделяется в колонке на зоны компонентов, выходящих отдельно друг от друга в порядке увеличения их сорбируемости	

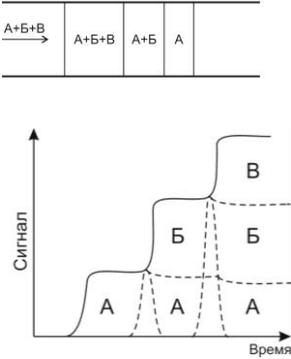
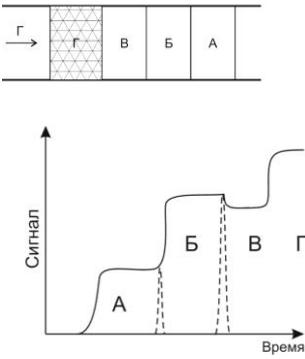
Название метода	Описание метода	Вид хроматограммы [9]
Фронтальная хроматография	<p>смесь веществ А+Б+В непрерывно вводится с подвижной фазой и разделяется в колонке на примыкающие друг к другу зоны с последовательно увеличивающимся числом компонентов, выходящих в порядке увеличения их сорбируемости</p>	 <p>The diagram illustrates frontal chromatography. The top part shows a column with a moving front of mixture A+B+V. The bottom part shows a step-like signal graph where the signal increases as components A, B, and V are detected in order of increasing retention time.</p>
Вытеснительная хроматография	<p>смесь веществ А+Б+В периодически вводится в поток подвижной фазы и вытесняется затем из колонки с помощью вещества-вытеснителя Г, десорбирующего все слабее удерживаемые компоненты смеси, причем в итоге смесь разделяется на примыкающие друг к другу зоны индивидуальных компонентов, выходящих в порядке увеличения их сорбируемости</p>	 <p>The diagram illustrates displacement chromatography. The top part shows a column where a displacer G moves through a mixture of A, B, and V. The bottom part shows a signal graph with distinct peaks for A, B, V, and G.</p>

Таблица 4. Классификация хроматографических методов по механизму разделения веществ

Название метода	Разделение происходит за счет...	Тормозящий процесс
Адсорбционная хроматография	различной сорбируемости веществ на твердом адсорбенте	физическая адсорбция
Распределительная хроматография	различной растворимости веществ в неподвижной жидкой фазе, нанесенной на зерна твердого носителя или стенки капилляра	растворимость
Эксклюзионная (ситовая) хроматография	различия в размерах молекул веществ и/или их форме	проникновение молекул сорбата в поры сорбента
Ионнообменная хроматография	различной скорости ионного обмена между подвижной и неподвижной фазами	ионный обмен
Лигандообменная хроматография	комплексообразования и/или распределения комплексов между подвижной и неподвижной фазами	комплексообразование
Хиральная (энантиоселективная) хроматография	энантиоселективности их взаимодействия с хиральными компонентами неподвижной и/или подвижной фазы	специфические взаимодействия
Афинная (биоспецифическая) хроматография	различия в их биоспецифическом взаимодействии с элементарными сорбционными центрами неподвижной фазы	специфические взаимодействия

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИИ

Хроматографический процесс представляет собой многократное перераспределение компонента между двумя фазами (неподвижной и подвижной). В газо-адсорбционной хроматографии элементарный акт сорбции сводится к адсорбции компонентов газовой смеси (сорбатов) на поверхности адсорбента с последующей их десорбцией, а в газо-жидкостной хроматографии – к абсорбции (растворению) компонентов газа неподвижной жидкой фазой, нанесенной на твердый носитель.

При хроматографировании одновременно происходят разделение веществ и размывание хроматографических пиков компонентов, приводящее к ухудшению разделения. Размытие хроматографического пика и ухудшение разделения в свою очередь влияет на характеристики качественного и количественного хроматографического анализа. Задача теории хроматографии – выявить причины размывания пиков и прогнозировать эффективность разделения смеси веществ.

Основным практически важным свойством хроматографической колонки является ее разделяющая способность, которая обусловлена такими параметрами как селективность и эффективность.

Селективность хроматографической колонки показывает, насколько прочно сорбент удерживает то или иное соединение. Она в большей степени обусловлена селективностью неподвижной жидкой фазы или адсорбента и оценивается с использованием фактора разделения $\alpha_{A/B}$ и коэффициента селективности колонки $K_{S,C}$ по отношению к веществам A и B (вещество B выходит позже вещества A):

$$\alpha_{A/B} = \frac{t'_{R(A)}}{t'_{R(B)}},$$

$$K_{s,c} = \frac{2 \cdot (t_R(B) - t_R(A))}{t_R(B) + t_R(A)}.$$

Эффективность колонки визуально можно определить по степени размытости хроматографического пика: чем уже пик, тем эффективнее колонка, т.е. тем лучше будет проходить разделение компонентов смеси. Количественно эффективность колонки оценивается с использованием величин: число теоретических тарелок N и высота, эквивалентная теоретической тарелке H .

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2,$$

$$H = \frac{L}{N},$$

где t_R – время удерживания компонента, w_b – ширина пика у основания, w_h – ширина пика на полувысоте (см. рис. 6), L – длина колонки.

Величины t_R , w_b и w_h должны быть выражены в одинаковых единицах измерения, N – безразмерная величина, единицы измерения H и L совпадают (чаще всего H выражается в мм).

Эффективность хроматографической колонки обусловлена большим количеством факторов, которые описаны в теории теоретических тарелок. Согласно данной теории хроматографическую колонку можно условно разделить на участки, на которых достигаются равновесия распределения анализируемого вещества (сорбата) между подвижной и неподвижной фазами (рис. 7). Такие участки называются теоретическими тарелками (ТТ), а длина участка – высотой, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ).

На рис. 7 изображена хроматографическая колонка с пятью теоретическими тарелками, подвижная фаза изображена белой частью, а неподвижная фаза – серой. Образец состоит из

двух компонентов, один из которых сорбируется (черные точки), а другой – не сорбируется (серые точки).

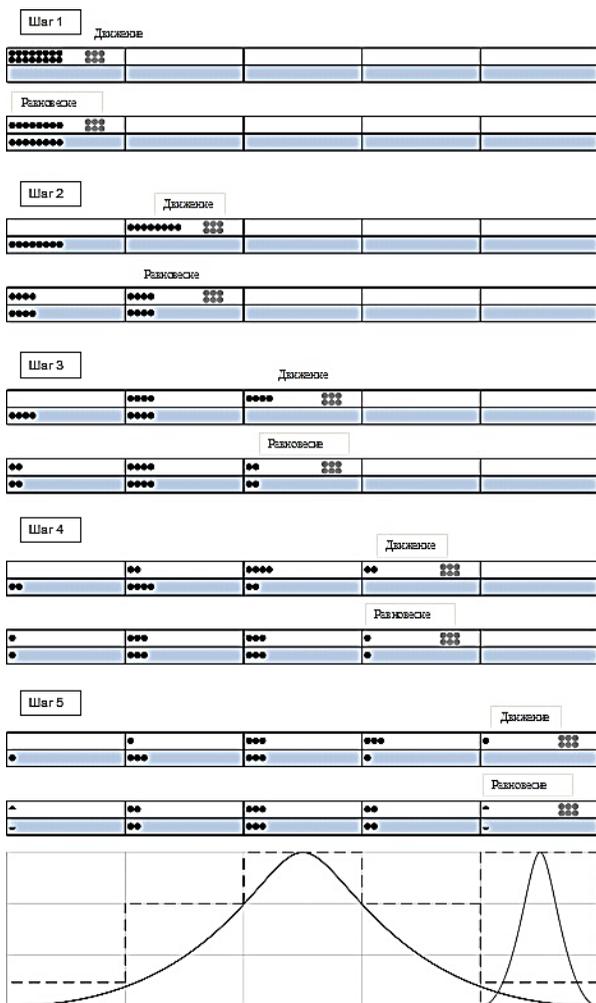


Рис. 7. Схематичное описание теории теоретических тарелок (описание в тексте)

Во время каждой стадии часть компонентов в подвижной фазе перемещается к следующей ТТ, и затем достигается равновесие для каждого сорбирующегося компонента в одной ТТ. В результате этих шагов последовательного перемещения и установления равновесия компоненты образуют вдоль колонки нормальное (гауссово) распределение.

Для оценки влияния различных факторов на эффективность колонки широко используется зависимость ВЭТТ от линейной скорости подвижной фазы (u), известная как уравнение Ван-Деемтера:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu,$$

где $A \sim 2\lambda d_p$ – вклад вихревой диффузии (d_p – диаметр зерна; λ – коэффициент неоднородности размеров зерна); $\frac{B}{u} \sim \gamma \cdot D_M$ – вклад молекулярной или продольной диффузии; γ – коэффициент извилистости сорбента; D_M – коэффициент диффузии сорбата в подвижной фазе; $Cu \sim \frac{k}{k+1} \cdot \frac{d_f}{D_s}$ – вклад скорости установления сорбционного равновесия (кинетический фактор) или внутридиффузионная массопередача; D_s – коэффициент диффузии сорбата в неподвижной фазе; d_f – толщина пленки неподвижной жидкой фазы; $\frac{k}{k+1}$ – доля молекул сорбата в неподвижной фазе.

Все описанные выше факторы способствуют размытию пика пробы по мере ее прохождения через колонку. Поскольку вклад каждого фактора зависит от средней скорости газа-носителя (u), существует значение данной величины – оптимальная скорость газа-носителя (u_{opt}), при которой значение ВЭТТ является минимальным. Таким образом, для обеспечения максимально возможной эффективности колонка должна работать при оптимальной скорости потока подвижной фазы u_{opt} , которую можно определить

по зависимости Ван-Деемтера в точке, соответствующей минимальному значению ВЭТТ (рис. 8).

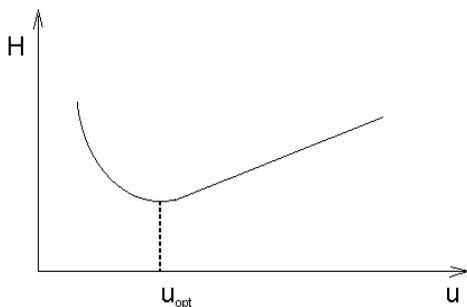


Рис. 8. Кривая Ван-Деемтера

Теория теоретических тарелок формальна: две колонки с одинаковыми N могут обеспечить различное качество разделения в зависимости от селективности выбранного сорбента.

Чем выше эффективность и селективность колонки, тем лучше ее разделительная способность — степень разделения или разрешение пиков:

$$R_S = \frac{t_R(B) - t_R(A)}{w_h(B) + w_h(A)}.$$

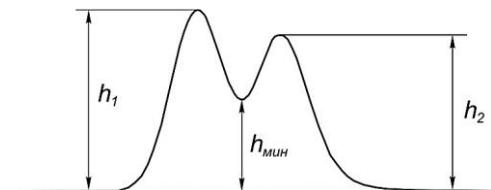
Степень разделения связана с эффективностью и селективностью колонки следующим соотношением:

$$R_S = \text{const} K_{S,C} \cdot \sqrt{N}.$$

Для не полностью разделенных пиков рассчитывают критерий разделения, который меняется от 0 (пики сливаются) до 1 (пики разделены полностью) (рис. 9).

$$\Psi = \frac{h_2 - h_{\min}}{h_2}.$$

Рис. 9.
Хроматограмма
неподеленных
пиков



Помимо размытия хроматографических пиков на точность хроматографического анализа [оказывает] влияние форма, т.е. симметричность или асимметричность пика. При проведении хроматографического анализа при значительной асимметрии пика его площадь перестает линейно зависеть от концентрации сорбата при ее последовательном уменьшении, что приводит к большим погрешностям при количественном анализе. При этом время удерживания увеличивается по мере уменьшения концентрации, что существенно затрудняет идентификацию пиков компонентов на хроматограмме (рис. 10).

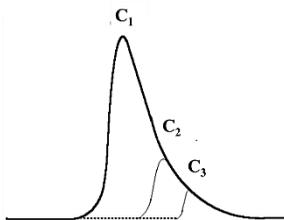


Рис. 10. Пример асимметричных пиков при различных концентрациях сорбата ($C_1 > C_2 > C_3$)

Причиной искажения формы пика является отклонение от линейности изотермы сорбции.

Изотерма сорбции – это зависимость величины сорбции a (или концентрации компонента, находящегося в сорбированном состоянии C_S) от концентрации сорбата в подвижной фазе C_M при $T = \text{const}$.

В общем случае величина сорбции a зависит от температуры, давления газа, концентрации сорбата в подвижной фазе C_M (т.е. концентрации компонента, находящегося в несорбированном состоянии), природы и структуры сорбата и сорбента (в том числе удельной поверхности сорбента).

При малых концентрациях C_M изотерма адсорбции представляет линейную зависимость и описывается следующим уравнением (изотерма сорбции Генри):

$$a = K_o C_M,$$

где $K_o = \frac{n_S + n_G}{n_G} = \varepsilon + \varepsilon_1 K_C = \frac{V_R \cdot j_3^2}{L \cdot A_C}$ – общий коэффициент рас-

пределения, равный отношению количества сорбата в единице объема колонки к количеству сорбата в единице объема подвижной фазы; n_S и n_M – количество сорбата в неподвижной фазе и подвижной фазах соответственно;

$\varepsilon = \frac{V_0}{V_C}$ – доля колонки, занятая подвижной фазой, равная от-

ношению свободного объема колонки V_0 , доступного для подвижной фазы, к объему всей колонки V_C ;

$\varepsilon_1 = \frac{V_S}{V_C}$ – доля колонки, занятая неподвижной фазой, равная

отношению объема колонки, занятого неподвижной фазой V_S , к объему всей колонки V_C (для ГЖХ $V_S = V_{SS} + V_L$ – суммарный объем подвижной фазы; V_{SS} – объем твердого носителя; V_L – объем неподвижной жидкой фазы и $\varepsilon_1 = V_L/V_C$, для ГАХ $\varepsilon_1 = 1 - \varepsilon$);

$K_C = \frac{C_S}{C_G} = \frac{n_S \cdot V_M}{V_S \cdot n_M}$ – константа распределения, равная отно-

шению концентрации сорбата в неподвижной фазе C_S к концентрации сорбата в подвижной (газовой) фазе C_M ;

$V_R = t_R \cdot F_C$ – удерживаемый объем (F_C – объемная скорость подвижной фазы);

$$j_3^2 = \frac{3}{2} \left[\frac{(P_i/P_o)^2 - 1}{(P_i/P_o)^3 - 1} \right] - \text{коэффициент Джеймса-Мартина или}$$

фактор коррекции на сжимаемость подвижной фазы (P_i – давление на входе в колонку, P_o – давление на выходе из колонки);

$$A_C = \pi \left(\frac{d_C}{2} \right)^2 - \text{площадь сечения колонки (} d_C \text{ – диаметр ко-}$$

лонки);

L – длина колонки.

В случае линейной хроматографии $\partial C_S / \partial C_M = \text{const}$ (рис. 11, прямая 1) В случае нелинейной хроматографии $\partial C_S / \partial C_M \neq \text{const}$, при этом возможны два случая: выпуклая изотерма (рис. 11, кривая 2) и вогнутая изотерма (рис. 11, кривая 3).

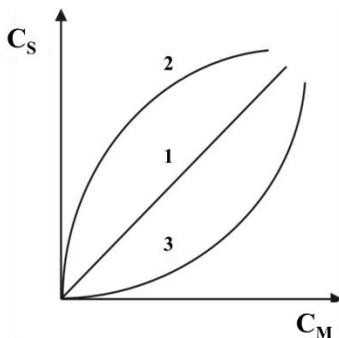


Рис. 11. Изотермы сорбции в условиях линейной и нелинейной хроматографии

При выпуклой изотерме области с малыми C_G перемещаются медленнее, чем с большими, т.е происходит размытие тыла хроматографического пика. При вогнутой изотерме области с малыми

C_G перемещаются быстрее областей с большими C_G , т.е. происходит преимущественное размытие фронта (рис. 12).

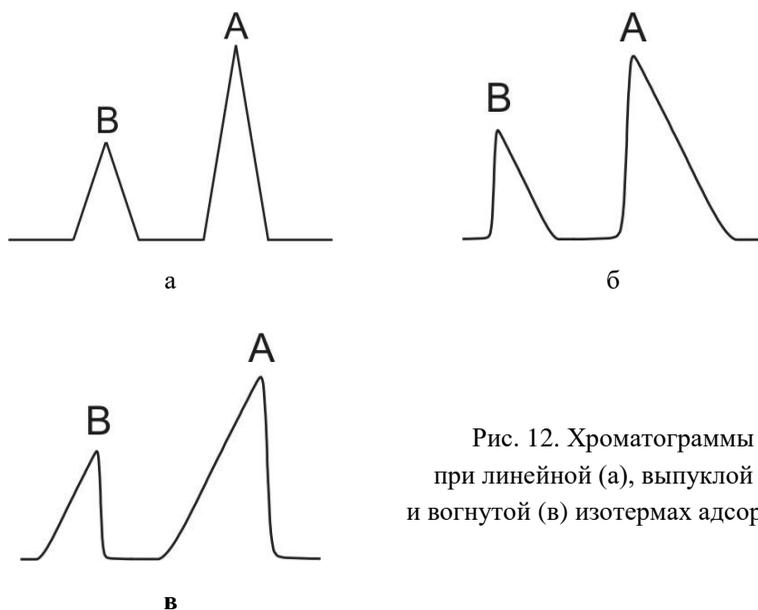


Рис. 12. Хроматограммы при линейной (а), выпуклой (б) и вогнутой (в) изотермах адсорбции

Таким образом, для выбора оптимальной хроматографической системы разделения следует учитывать факторы, связанные как с конфигурацией хроматографической колонки (насадочная или капиллярная, природа адсорбента или неподвижной жидкой фазы, размеры частиц и плотность их упаковки в колонке, толщина пленки неподвижной жидкой фазы), так и с параметрами проведения процесса (скорость газа-носителя или элюента, температура). В жидкостной хроматографии большое влияние на разделительные свойства хроматографической системы оказывает состав элюента.

АППАРАТУРНОЕ ОФОРМЛЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

В аналитических хроматографах используют проявительный вариант хроматографии, в этом случае подвижная фаза непрерывно проходит через хроматографическую колонку и попадает в детектор. Современный хроматограф состоит из следующих основных частей:

- источник подвижной фазы, включая блок подготовки подвижной фазы и систему регулирования ее скорости;
- узел ввода пробы;
- хроматографическая система разделения (хроматографическая колонка в термостате);
- система детектирования и обработки результатов измерения.

На рис. 13 представлены схемы хроматографов для газовой и жидкостной хроматографии.

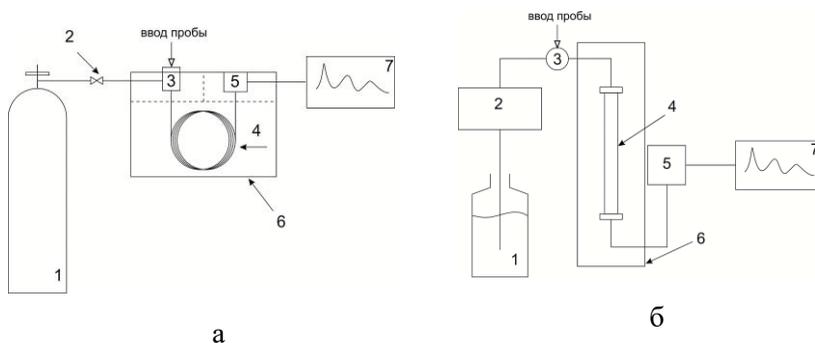


Рис. 13. Схемы газовой (а) и жидкостной (б) хроматографов:
1 – источник подвижной фазы (1а – баллон с газом-носителем, 1б – сосуд с элюентом); 2 – блок подготовки подвижной фазы (2а – регулятор расхода газа-носителя, 2б – насос высокого давления), 3 – система ввода пробы, 4 – хроматографическая колонка, 5 – детектор, 6 – термостат, 7 – система обработки сигнала детектора (регистратор, компьютер)

Источник подвижной фазы

В газовой хроматографии в качестве источника подвижной фазы выступают баллоны со сжатым газом или устройства для получения чистых газов, например, генератор водорода. Между источником подвижной фазы и входом в хроматографическую колонку подключается ряд устройств, часто объединяемых в один блок, назначение которого – установка, стабилизация, измерение и очистка потока газа-носителя.

Блок подготовки газов состоит из фильтров для очистки газа, регуляторов давления и расхода газа-носителя, дросселей тонкой регулировки подачи газа-носителя, измерительных манометров. Для газовой хроматографии специальных побудителей расхода не требуется, т.к. газ-носитель в баллонах под большим давлением и расход газа-носителя создается за счет перепада давления на входе и выходе колонки. В качестве подвижной фазы в газовой хроматографии используются, как правило, легкие инертные газы (азот, гелий, водород, воздух, аргон и др.), которые практически нерастворимы в неподвижной жидкой фазе или практически не сорбируются адсорбентом и выполняют при обычных давлениях (менее $4,0-5,0 \text{ кгс/см}^2$) только транспортные функции, различаясь лишь вязкостью и коэффициентом диффузии сорбатов в газе-носителе.

- ✓ Азот обладает высокой вязкостью, что позволяет получать достаточно узкие пики. Отличается низкой стоимостью, безопасен в работе. Недостаток – низкая теплопроводность, близкая к легким углеводородам, не обеспечивает высокой чувствительности ДТП.
- ✓ Водород имеет малую вязкость, что позволяет работать с длинными колонками и высокую теплопроводность, что обеспечивает высокую чувствительность детектора по теплопроводности. Легко получается в чистом виде электролизом

воды. Недостаток – повышенная взрывоопасность, малая вязкость способствует размытию хроматографических зон.

- ✓ Гелий обладает теплопроводностью, близкой к водороду, безопасен в работе. Недостаток – высокая стоимость, обусловленная сложностью получения и очистки.
- ✓ Воздух как газ-носитель удобно применять в промышленных хроматографах, работающих на технологических установках, он доступен и дешев. Недостаток – кислород воздуха может окислять неподвижную жидкую фазу и сорбаты.
- ✓ Диоксид углерода ранее широко использовали с объемными интегральными детекторами (азотометр), в настоящее время применяется в сверхкритической флюидной хроматографии.

Следует учитывать, что газ-носитель не только переносит компоненты анализируемой смеси по хроматографической колонке, но может также влиять на характеристики разделения и работу детектора. Некоторые газы используются в качестве вспомогательных для функционирования ряда детекторов, например, водород и воздух – для пламенно-ионизационного.

В жидкостной хроматографии в качестве источника подвижной фазы выступают емкости с элюентами, однако для передвижения подвижной фазы по системе требуются специальные побудители расхода – насосы, которые делятся на насосы среднего и низкого давления и насосы высокого давления. В комплекс для подготовки подвижной фазы также входят: фильтры для очистки элюента, смеситель для смешанных подвижных фаз, дегазатор и др. В современных приборах данные узлы являются неотъемлемой частью системы. В случае, когда подобных устройств в составе хроматографа нет, процедуры смешения элюентов, их очистки и дегазации обязательно проводят перед началом анализа. В каче-

стве элюентов в жидкостной хроматографии чаще всего используют воду и водные растворы ацетонитрила, метанола, изопропанола (обращенно-фазовый режим хроматографирования), а также гексан, гептан, тетрагидрофуран (нормально-фазовый режим хроматографирования). Состав элюента в жидкостной хроматографии является одним из ведущих факторов регулирования разделительной способности системы.

Узел ввода пробы

Дозаторы предназначены для ввода в хроматографическую колонку точно выбранного количества анализируемой пробы. Они должны обеспечивать:

- максимальную точность и воспроизводимость размера пробы, а также условий ее ввода в колонку;
- минимальное разбавление пробы подвижной фазой;
- неизменность качественного и количественного состава пробы до и после дозирования;
- исключение резких изменений условий работы колонки и других узлов во время ввода пробы, т.е. ввод пробы без нарушения динамического равновесия в системе.

Жидкие пробы вводятся в газовые хроматографы микрошприцами на 1, 5, 10, 50 мкл через термостойкое резиновое уплотнение испарителя. Общий вид таких микрошприцев изображен на рис. 14.



Рис. 14. Общий вид микрошприца

Микрошприц состоит из стеклянного цилиндра с калиброванным внутренним объемом, иглы и металлического поршня.

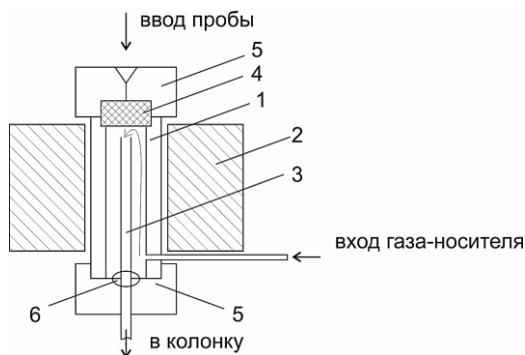
Шприцы для малых дозировок имеют рабочий объем, заключенный во внутреннем объеме иглы.

При вводе жидких проб хроматограф должен быть укомплектован испарителем (рис. 15), в котором проба практически мгновенно испаряется, смешивается с газом-носителем и поступает в хроматографическую колонку.

Газ-носитель поступает в нижнюю часть корпуса испарителя и транспортирует испарившуюся пробу в колонку для разделения. Температура испарителя должна превышать температуру кипения самого высококипящего соединения, верхний предел температуры испарителя ограничивается температурой деструкции анализируемых соединений. В основном, температура испарителя превышает температуру колонки на 30-50°C. Материал вставки испарителя не должен взаимодействовать с компонентами смеси.

Рис. 15. Узел ввода пробы (испаритель) в насадочную колонку:

- 1 – корпус;
- 2 – электрообогрев зоны испарения пробы;
- 3 – стеклянный вкладыш;
- 4 – резиновая мембрана;
- 5 – накидные гайки;
- 6 – графитовое уплотнение



Для ввода газообразных проб в современных хроматографах чаще всего применяются поворотные краны. Такой кран состоит из неподвижного корпуса со штуцерами для подвода газа-носителя и анализируемого газа и сверху движущейся поворотной втулки с каналами, соединяющими линии газа-носителя и анализируемого газа. На корпусе устанавливается трубка-дозатор (калиброванная петля) для точного ввода пробы. Корпус и вращающаяся втулка

сильно прижаты друг к другу, их контактирующие поверхности тщательно отполированы и при повороте должны плавно скользить относительно друг друга. Такие краны могут быть 6, 8, 10 и даже 14-ходовые (или портовые). Чаще всего для дозирования применяются 6-ходовые краны. Схема ввода газовой пробы таким краном показана на рис. 16.

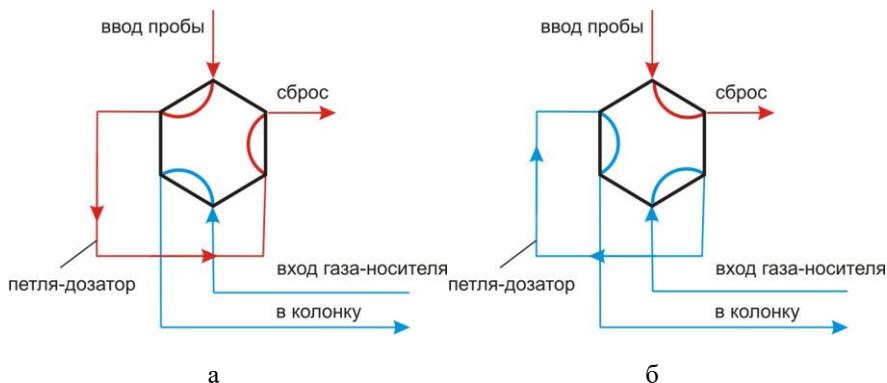


Рис. 16. Схема функционирования крана-дозатора при заполнении пробоотборной петли крана пробой (а) и ввода пробы в потоке газа-носителя в колонку (б)

В положении *а* проходит заполнение калиброванной петли газовой пробой. Поворот крана может проводиться вручную или автоматически, электрическим или пневматическим приводом, в результате этого происходит переключение потоков и через калиброванную петлю проходит газ-носитель, который переносит точно отмеренный объем анализируемого газа в хроматографическую колонку для разделения.

Ввод пробы в капиллярные колонки имеет ряд особенностей. Поскольку объем такой колонки намного меньше, чем насадочной, то и объем вводимой пробы должен составлять 0,01–0,001 мкл. Обычными способами осуществить ввод такого объема пробы не-

возможно, поэтому используют устройство, позволяющее разделить пробу на две неравные части – делитель потока.

В испаритель вводится обычное количество пробы (0,1–10 мкл), она испаряется, и смесь паров пробы с газом-носителем попадает в делитель потока, где разделяется на два неравных по своему объему и скорости потока: меньший по объему поток поступает в хроматографическую колонку, больший объем – сбрасывается в атмосферу. Проба делится в отношении, определяемом отношением скоростей двух указанных потоков. Численное значение величины отношения этих потоков называется отношением деления, оно может принимать значение от 1 : 10 до 1 : 1000.

В жидкостной хроматографии используются аналогичные системы ввода пробы.

Хроматографическая система разделения

Проба, введенная в дозатор, захватывается потоком подвижной фазы и направляется в хроматографическую систему разделения, представляющую собой хроматографическую колонку в термостате. Основная задача хроматографической колонки состоит в разделении многокомпонентной смеси на отдельные компоненты, выходящие в потоке подвижной фазы. Если целью хроматографирования является получение компонента первоначальной смеси в индивидуальном виде, то подобная колонка называется препаративной. Если целью является анализ многокомпонентной смеси после ее разделения, то колонку называют аналитической.

Газохроматографические аналитические колонки в зависимости от геометрических размеров (внутреннего диаметра и длины) делятся на насадочные, микронасадочные и капиллярные.

Насадочные колонки характеризуются величиной внутреннего диаметра 2–5 мм, длина обычно составляет от 1 до 3 м. Форма колонок – прямая, U-образная, спиральная – определяется, как правило, размерами термостата. В качестве материала для изготовления таких колонок используются нержавеющая сталь, алюминий, реже стекло (рис. 17).



Рис. 17. Фотография стеклянной (слева) и стальной (справа) насадочных колонок

Микронасадочные колонки имеют внутренний диаметр 0,5–2 мм, они появились как результат попытки сочетать достоинства насадочных и капиллярных колонок.

Внутренний диаметр капиллярных колонок составляет 0,1–0,5 мм, длина может меняться от 10 до 100 м. Изготавливаются они преимущественно из стекла или кварца.

В газовой хроматографии колонки могут быть заполнены либо адсорбентом (газо-адсорбционный вариант), либо твердым носителем с нанесенной на него малолетучей жидкостью, называемой также *неподвижной жидкой фазой* (газо-жидкостный вариант). Насадочные колонки заполняются сорбентами в виде гранул, в капиллярных колонках сорбент находится на стенках капилляра (такие колонки называют открытые или полые) (рис. 18).



Рис. 18. Внешний вид (а) и строение (б) капиллярной колонки

Для капиллярных колонок существует дополнительная классификация в зависимости от типа неподвижной фазы и организации внутреннего пространства:

- колонки, содержащие на внутренних стенках капилляра пленку неподвижной жидкой фазы (Wall coated open tubular – WCOT);
- колонки, содержащие на внутренних стенках капилляра слой пористого адсорбента (Porous layer open tubular – PLOT);
- колонки, содержащие на внутренних стенках капилляра слой пористого адсорбента, пропитанный неподвижной жидкой фазой (Support coated open tubular – SCOT).

Основным фактором, влияющим на эффективность и селективность разделения в газо-адсорбционной хроматографии, является совокупность структурных и химических характеристик адсорбентов. К первым относятся величина удельной площади поверхности, размер пор, распределение пор по размеру, суммарный объем пор, ко вторым – гидрофобность или гидрофильность поверхности, наличие функциональных групп.

По геометрической структуре поверхности адсорбенты делят на 4 типа:

– непористые адсорбенты, удельная поверхность которых колеблется от сотых долей до сотен $\text{м}^2/\text{г}$ (графитированная термическая сажа, аэросил (мелкозернистый диоксид кремния), кристаллы солей);

– однородно макропористые адсорбенты, удельная поверхность которых составляет 25-50 $\text{м}^2/\text{г}$ (силохромы, полимерные сорбенты);

– однородно микропористые адсорбенты, удельная поверхность которых составляет порядка тысяч $\text{м}^2/\text{г}$ (молекулярные сита (цеолиты), углеродные молекулярные сита, сверхсшитые полистирольные сорбенты и др.);

– неоднородно пористые адсорбенты (различные силикагели, содержащие как широкие, так и узкие поры).

По химической природе адсорбенты делят на:

– углеродные и углеродсодержащие сорбенты (активированный уголь, графитированная сажа);

– неорганические сорбенты (оксид алюминия, модифицированные и немодифицированные силикагели, молекулярные сита);

– полимерные сорбенты (порапаки, полисорббы, тенакты, хромосорббы, полимерные смолы ХАД, сверхсшитые полистиролы).

По селективности разделения сорбенты делят на:

– универсальные (силикагели, модифицированные С18, нейтральные полимерные средней шивки и сверхсшитые, углеродные материалы);

– групповые, т.е. с межгрупповой селективностью (неорганические (силикагель, флоризил, окись алюминия), силикагельные и полимерные бифункциональные материалы);

– селективные (с ограниченно доступной поверхностью (RAM), импринтные, аффинные).

В газо-жидкостной хроматографии эффективность и селективность разделения обусловлена в первую очередь химической

природой неподвижной жидкой фазы. По полярности неподвижные жидкие фазы условно можно разделить на 3 группы: неполярные, среднеполярные и полярные (табл. 5).

Таблица 5. Наиболее используемые неподвижные жидкие фазы

Химический состав		Традиционное название НЖФ	Марки аналогичных капиллярных колонок различных производителей
← Полярность увеличивается	100% полидиметилсилоксан, углеводороды с большой молекулярной массой	Апиезон, ПМС-1000, OV-1	ZB-1, Rtx-1, Rtx-1 PONA, DB-1, SPB-1, SPB-1, SE-30, HP-1, HP-101, CP-Sil 5 CB
	5% - фенил - 95% - диметилполисилоксан	OV-5	ZB-5, Rtx-5, DB-5, SPB-5, PTE-5, SE-54, PTA-5, HP-5, BP5, BPX5, CP-Sil 8 CB, VF-5M, VF-5ms,
	35% - фенил - 65% - диметилполисилоксан	OV-11	ZB-35, Rtx-35, Rtx-35MS, DB-35ms, DB-35, MDM-35, SPB-35, SPB-608, HP-35, HP-35ms, AT-35, BPX35, BPX608,
	50% - фенил - 50% - диметилполисилоксан	OV-17	ZB-50, Rtx-50, DB-17, DB-17ms, DB-17HT, SPB-17, SPB-50, HP-50+, BPX50, CP-Sil 24 CB

Химический состав	Традиционное название НЖФ	Марки аналогичных капиллярных колонок различных производителей
6% - цианопропилфенил -94% - метилполисилоксан	OV-6	ZB-624, Rtx-1301, Rtx-624, DB-1301, DB-624, DB-VRX, SPB-1301, SPB-624, HP-VOC, AT-624, AT-1301, BP624, CP-1301, CP-Select-624 CB,
14% - цианопропилфенил -86% - метилполисилоксан	OV-1701	ZB-1701, Rtx-1701, DB-1701, SPB-1701, BP10, CP-Sil 19 CB
Полиэтиленгликоль	ПЭГ-20М, Carbowax 20M	ZB-WAX, Rtx-WAX, Stabilwax-DB, DB-WAXetr , HP-INNOwax, CP-Wax 57 CB, DB-Wax, Supelco wax 10, HP-20M, Carbowax-20M, CP-Wax 52 CB
Полиэтиленгликоль, модифицированный нитротерефталатом	OV-351	ZB-FFAP, DB-FFAP, SPB-100, HP-FFAP , BP21, CP-Wax 58 (FFAP) CB, CP-FFAP CB

Фазу для разделения выбирают по принципу «подобное разделяется на подобном», т.е. углеводороды лучше всего разделяются на неполярной фазе типа ПМС-1000 или апиэзон, а спирты – на полярной ПЭГ-20М.

По температурному пределу использования все неподвижные жидкие фазы можно разделить на три группы: низкотемпературные (до 100°C), среднетемпературные (до 200°C) и высокотемпературные (до 350°C и выше).

В особую группу можно отнести колонки с жидкими кристаллами в качестве неподвижной жидкой фазы, а также фазы, обеспечивающие специфические взаимодействия, например, на основе комплексообразования. Подобные колонки обеспечивают высокую селективность при разделении изомеров.

В жидкостной хроматографии выбор неподвижной фазы не так широк, как в газовой. В качестве сорбентов в основном используются силикагели с привитыми функциональными группами, как неполярными (C8, C18), так и полярными (NH₂). В первом случае в качестве элюента используются смеси полярных органических растворителей (ацетонитрил, метанол, изопропанол) с водой, во втором – неполярные соединения (гексан, гептан, тетрагидрофуран).

Детекторы

Хроматография – гибридный метод: вначале на колонке происходит разделение анализируемой смеси на отдельные компоненты, а затем детектор, расположенный после хроматографической колонки, определяет содержание разделенных компонентов в потоке подвижной фазы. Выдающиеся хроматографисты А. А. Жуховицкий и Н. М. Туркельтауб отмечали, что «... история развития газовой хроматографии в известной мере представляет собой историю развития детектора...».

Детектор – это прибор, позволяющий фиксировать какое-либо физико-химическое свойство бинарной смеси, определяемое ее составом. В современной хроматографии используют дифференциальные детекторы, которые условно делят на ионизационные и

неионизационные. Кроме того, детекторы подразделяют на деструктивные и недеструктивные, а также универсальные и селективные. Большинство ионизационных детекторов являются селективными и деструктивными, а большинство неионизационных детекторов – универсальными и недеструктивными. Деструктивным детектором считают тот, в котором более чем 1% анализируемых компонентов разлагаются или реагируют с образованием других соединений. Ионизационным называют такой детектор, в котором анализируемые соединения под действием различных факторов (водородное пламя, β -излучение, УФ-излучение, высокочастотный разряд и др.) превращаются в отрицательные или положительные ионы, которые собираются на электродах и регистрируются. Детекторы подразделяются на концентрационные и потоковые. Сигнал концентрационного детектора зависит от мгновенной концентрации компонента в смеси с газом-носителем, а сигнал потокового определяется числом молекул анализируемого компонента, достигших чувствительного элемента в данный момент времени.

Работу детектора можно охарактеризовать следующими параметрами: чувствительность, линейный динамический диапазон, селективность, инерционность.

Чувствительность детектора оценивается с использованием характеристики «предел детектирования» (рис. 19).

Предел детектирования – это минимальная концентрация (масса или массовый расход) контрольного компонента, доступная для обнаружения хроматографическим детектором в потоке подвижной фазы (т.е. дающий выходной сигнал детектора в 2 раза превышающий уровень флуктуации нулевого сигнала).



Рис. 19. Определение уровня шума и полезного сигнала

Рассчитывается данная величина по следующим формулам:

- для потокового детектора

$$C_{min} = \frac{2 \cdot \Delta_x \cdot C \cdot V_{np}}{\bar{Q}},$$

- для концентрационного детектора

$$C_{min} = \frac{2 \cdot \Delta_x \cdot C \cdot V_{np}}{\bar{Q} \cdot F},$$

где Δ_x – значение уровня флуктуации шумов нулевого сигнала (определяется как максимальное значение амплитуды повторяющихся колебаний нулевого сигнала с полупериодом не более 10 секунд), V ; C – концентрация компонента в контрольной смеси, г/мл; V_{np} – объем вводимой пробы, мл; \bar{Q} – среднее арифметическое значение площади пика, В·с; F – расход подвижной фазы, мл/с.

Селективность детектора определяется спектром веществ, которые он может детектировать. К универсальным детекторам (т.е. способным определять все вещества) в газовой хроматографии относятся детектор по теплопроводности, в жидкостной – рефрактометрический детектор. Селективные детекторы способны определять узкий круг веществ. Так, например, электронно-захватный детектор используется для анализа хлор- и азотсодержащих соединений, пламенно-фотометрический – серосодержащих.

Пламенно-ионизационный детектор с одной стороны является селективным, поскольку определяет только органические соединения, способные к ионизации в пламени водородной горелки, с другой стороны, он является универсальным по отношению ко всем органическим соединениям.

Как правило, с увеличением селективности детектора возрастает его чувствительность к определяемым соединениям.

Линейный динамический диапазон (ЛДД)

В ходе хроматографического анализа часто используют стандартные пробы для расчета коэффициента чувствительности (отношение площади пика к массе анализируемого компонента), который затем применяется в ходе дальнейших анализов. Постоянством коэффициента чувствительности определяется линейность сигнала детектора (рис. 20).

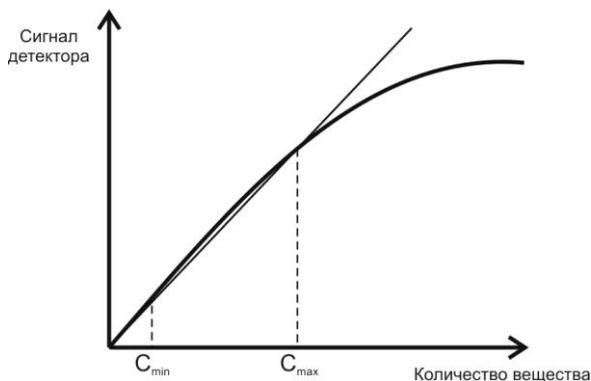


Рис. 20. Линейный динамический диапазон

Значение C_{\max} определяют при отклонении от линейности не более 3%.

Таблица 6. Основные характеристики газохроматографических детекторов [10]

Вид детектора	Тип	Селективность (по отношению к указанным веществам)	Типичное минимально детектируемое количество	Линейный динамический диапазон
Пламенно-ионизационный	Селективный	Вещества, ионизирующиеся в водородном пламени	5 пг С/с	10 ⁷
По теплопроводности	Универсальный	Все вещества, отличающиеся по теплопроводности от газа-носителя	400 пг /мл газа-носителя	10 ⁶
Электронно-захватный	Селективный	Электрофильные, в газовой среде	0,1 пг Сl/с (варьирует в зависимости от структуры)	10 ⁴
Фотоионизационный	Селективный	Вещества, ионизирующиеся в УФ-свете	2 пг С/с	10 ⁷
Термоионизационный	Селективный	N, P, гетероатомы	0,4 пг N/с 0,2 пг P/с	10 ⁴ 10 ⁴
Пламенно-фотометрический	Селективный	S, P	20 пг S /с 0.9 пг P /с	10 ³ 10 ⁴

Вид детектора	Тип	Селективность (по отношению к указанным веществам)	Типичное мини- мально детекти- руемое количе- ство	Линей- ный дина- миче- ский диапа- зон
Инфракрасный спектрометри- ческий с преоб- разованием Фурье	Универ- сальный	Молекулярные колебания	1000 пг вещества, хорошо поглоща- ющего ИК- излучение	10^3
Масс- спектрометри- ческий	Универ- сальный	Настраивают на любое соедине- ние	от 10 пг до 10 нг (в зави- симости от режима – реги- страции отдель- ных ионов или пол- ного ска- нировани я)	10^5
Атомно- эмиссионный	Универ- сальный	Настраивают на любой элемент	0,1 – 20 пг/с (в зависимо- сти от элемента)	10^4

Инерционность или быстродействие характеризует способность детектора реагировать на изменение концентрации вещества в детекторе.

Если в детекторе в момент времени t_0 скачкообразно изменить концентрацию, его сигнал от начального значения E_0 до значения E_1 , отвечающего новой концентрации, изменяется не мгновенно, а с некоторым запаздыванием τ_0 (рисунок 21). Чем меньше τ_0 , тем быстрее реагирует детектор, и тем меньшие искажения появляются при записи хроматограмм.

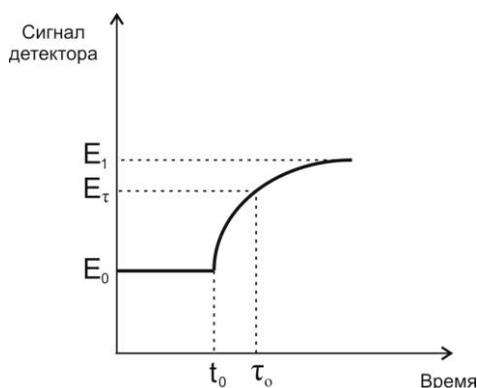


Рис. 21. Зависимость сигнала детектора E от времени

Инерционность детектора является следствием как объема камеры, так и ограниченной скорости физико-химических процессов при формировании сигнала детектора. Большая инерционность ДТП определяется скоростью процессов теплопередачи, которая значительно меньше скорости образования и сбора зарядов в ионизационных детекторах.

К наиболее широко используемым детекторам в газовой хроматографии относятся детектор по теплопроводности, пламенно-ионизационный, пламенно-фотометрический, электронно-захватный детекторы, в жидкостной хроматографии – спектрофотометрические, рефрактометрический и электрохимические детекторы.

Детектор по теплопроводности (ДТП)

Детектор по теплопроводности был создан еще до появления методов газовой хроматографии. Благодаря простоте, малой стоимости и универсальности он и до настоящего времени находит широкое применение в газохроматографической аппаратуре. Из-за относительно большой инерционности ДТП не применяют для работы с капиллярными колонками.

ДТП реагирует на любое соединение, теплопроводность которого отличается от теплопроводности газа-носителя. В качестве газа-носителя рекомендуется применять гелий из-за его исключительно высокой теплопроводности и химической инертности. При этом достигается очень высокая чувствительность, так как разность между теплопроводностью гелия и любого другого соединения (за исключением водорода) оказывается очень большой. Другие газы-носители имеют теплопроводность, близкую к теплопроводности анализируемых соединений, соответственно и чувствительность оказывается значительно ниже.

Если в газе-носителе содержится какое-либо вещество, теплопроводность смеси снижается и нагревательный элемент (металлическая нить) теряет меньше тепла. При постоянном напряжении температура нагревательного элемента повышается, соответственно увеличивается его сопротивление. Это изменение измеряют и записывают с помощью самописца.

Нагревательные элементы (нити) изготавливают из самых разнообразных материалов: вольфрама, покрытого золотом, или (в последнее время) сплавов вольфрама с рением. Нагревательные элементы пассивируют оксидными слоями для того, чтобы они меньше реагировали с химически активными пробами.

Так как ДТП является недеструктивным детектором, его включают последовательно с другими детекторами или можно со-

брать исследуемое вещество в охлаждаемой ловушке для дальнейших испытаний.

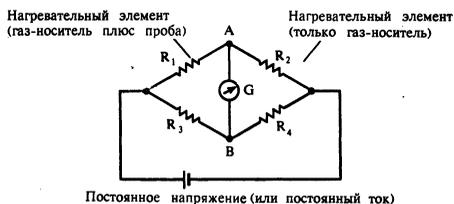
Первоначальная (используемая и в настоящее время) схема включения ДТП представляет собой мост Уинстона (рис. 22).

Рис. 22. Мостовая схема

Уинстона для ДТП.

Измеряется напряжение между точками А и В;

G – измерительный прибор



Разность теплопроводности газового потока, поступающего из колонки (газ-носитель вместе с пробой, R_1), и потока сравнения (только газ-носитель, R_2) пропорциональна напряжению на диагонали моста. Запись этого напряжения компьютером и является собственно хроматограммой.

При использовании ДТП следует определить два параметра: температуру детектора и скорость потоков газа. При выборе температуры детектора необходимо учитывать чувствительность, срок службы нагревательного элемента (нити) и температуру кипения анализируемых веществ. Чем ниже температура детектора, тем выше чувствительность и срок службы нити, в то же время высокая температура детектора необходима для того, чтобы вещества находились в газообразном состоянии.

Пламенно-ионизационный детектор (ПИД)

Наряду с ДТП пламенно-ионизационный детектор является одним из самых широко распространенных. Обслуживание ПИД довольно просто, этот детектор способен обнаруживать большое количество органических соединений.

В ПИД используется пламя сгорания водорода в воздухе; в этом пламени происходит ионизация элюированных органических

соединений. Если коллектор находится под напряжением и помещен вблизи пламени, ионы захватываются коллектором и создают ток, пропорциональный количеству вещества в пламени.

Как показано на рис. 23, элюат из колонки смешивается с водородом, а затем попадает в пламя (воздух подводится отдельно). Профиль пламени и его близкое расположение к зоне детектирования оказывают решающее влияние на чувствительность.

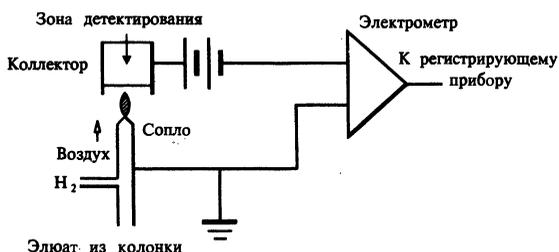


Рис. 23. Схема ПИД

Пламенно-фотометрический детектор (ПФД)

Для биохимических анализов, а также для исследования продуктов питания и окружающей среды оказался очень полезным детектор, позволяющий селективно определять серо- и фосфорсодержащие соединения. При этом отпадает необходимость проводить длительную и сложную подготовку проб. Именно это определило широкую распространенность ПФД.

Действие детектора основано на том, что серо- и фосфорсодержащие соединения образуют в пламени (аналогично ПИД) частицы, обладающие хемилюминесцентными свойствами. Возбужденные молекулы испускают световые лучи с определенной длиной волны, характерной для элементов, присутствующих в пробе. Оптический фильтр пропускает к фотоумножителю только излучение определенной длины волны, а электронный блок, подключенный к приемнику, дает соответствующий выходной сигнал (рис. 24).

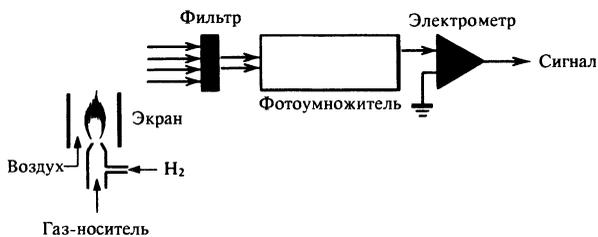


Рис. 24. Схема ПФД

Химические реакции, протекающие в пламени, имеют сложный комплексный механизм, тесно связанный со скоростью потока газа и температурой. Из соединений серы образуются частицы $S = S^*$, а из фосфорных – возбужденные частицы HPO^* . При распаде метастабильные промежуточные частицы выделяют энергию в виде фотонов с соответствующей длиной волны.

Вследствие реакции серы в пламени (образование $S = S^*$) интенсивность излучения света нелинейно связана с концентрацией серы, а именно приблизительно пропорциональна квадрату концентрации атомов серы.

Электрозахватный детектор (ЭЗД)

Электрозахватный детектор был сконструирован на основе прибора, который изобрел в 1948 г. Джеймс Лавлок для измерения малейших воздушных потоков. В то время он занимался исследованием гриппа и попутно установил, что дым от сигарет и газообразные хлорированные углеводороды мешают работе прибора. В настоящее время ЭЗД благодаря своей чувствительности к галогенам применяют в основном для анализа пестицидов.

Принцип работы ЭЗД основан на том, что электроотрицательные частицы (СХ) захватывают тепловые электроны с образованием отрицательных ионов. Количество захваченных ионов зависит от массы и структуры анализируемого соединения.



Для получения тепловых электронов (с низкой энергией) газ-носитель ионизируют β -частицами (электронами с высокой энергией) радиоактивного источника. Возникающий электронный ток измеряется чувствительным прибором. Когда молекулы пробы достигают ячейки детектора, они захватывают электроны, которые в ином случае попадали бы на коллектор и давали бы ток в цепи детектора. Таким образом, количественные результаты анализа основываются на соответствующем снижении тока.

В первых детекторах на коллектор подавалось постоянное напряжение. В современных приборах для того, чтобы расширить динамический диапазон, используют импульсы напряжения и поддерживают постоянными частоту или напряжение на ячейке (рис. 25). Наложенный на электроды импульс напряжения периодически собирает электроны, не захваченные веществом. Во время этого импульса регистрируются только свободные электроны, так как более тяжелые отрицательные ионы не могут достигнуть электродов за короткое время импульса и удаляются из ячейки детектора газом-носителем.

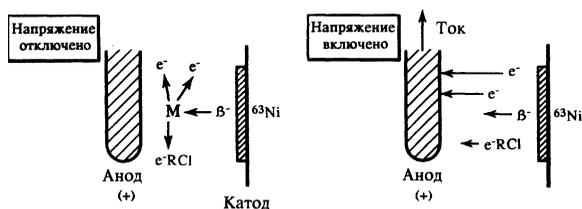


Рис. 25. Движение электронов во время импульсного напряжения на ЭЗД

- β^- - β -частица
- M - молекула газа-носителя
- e^- - вторичные электроны с низкой энергией
- e^-RCl - электрофильная молекула с захваченным электроном

Органические полигалогениды представляют собой соединения с высоким сродством к электрону. К соединениям, в составе которых находятся кислород, фосфор или ароматические кольца, ЭЗД менее чувствителен. Такие соединения, как пара-

фины и простые углеводороды, почти не захватывают электроны и не могут регистрироваться с помощью ЭЗД.

Для работы ЭЗД используют в качестве газа-носителя азот особой чистоты, т.к. наличие примесей нарушает работоспособность системы (уменьшает рабочий диапазон).

Масс-селективный детектор (МСД)

Уже давно масс-спектрометр рассматривают как отличный детектор для газовой хроматографии. Полученные с его помощью спектры дают такую информацию о качественном составе пробы, какую не могут дать иные газохроматографические детекторы.

При бомбардировке электронами молекул в газообразном состоянии связи в молекулах разрываются и образуются ионы. Вид и количество образующихся фрагментов характерны для данной молекулы. При наложении магнитного поля положительно заряженные частицы ускоряются и движутся по изогнутым кривым, радиус кривизны которых пропорционален корню квадратному из массы иона. При некотором постоянном магнитном поле поток ионов, содержащий ионы с идентичным отношением масса/заряд, попадает на коллектор. Здесь при разряде ионов возникает ток, пропорциональный отношению количества ионов с соответствующей массой. Изменением магнитного поля постепенно переводят на коллектор потоки ионов с другим отношением масса/заряд. Ток коллектора записывается и дает масс-спектрограмму.

В квадрупольном масс-спектрометре (рис. 26) разделение по массе достигается следующим образом. Между четырьмя постоянными магнитами образуется высокочастотное электрическое поле. Когда пучок ионов попадает в это поле, только ионы с определенным отношением масса/заряд имеют стабильную траекторию и попадают на детектор (коллектор). Детектирование пучков с различным отношением масса/заряд проводят варьированием электрического поля.

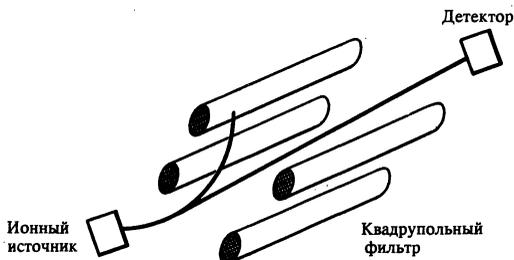


Рис. 26. Схема устройства квадрупольного масс-спектрометра

Существует принципиальная проблема несовместимости газовой хроматографии и масс-спектрометрии, поскольку масс-спектрометр работает при давлении 10^{-6} торр, а газовый хроматограф при нормальном давлении. Для того чтобы преодолеть эту несовместимость, предложен целый ряд соединительных устройств (интерфейсов).

Детекторы для жидкостной хроматографии

Фотометрические детекторы являются универсальными для веществ, поглощающих свет в соответствующей области спектра (длины волн 190-600 нм). Они подразделяются на детекторы с фиксированной длиной волны, детекторы с длиной волны, дискретно изменяемой с помощью оптических фильтров, (фильтровые фотометры) и спектрофотометрические детекторы с плавно изменяемой длиной волны.

В фотометрических детекторах монохроматический пучок света (т.е. излучение с определенной длиной волны) проходит через рабочую и сравнительную камеры детектора (рисунок 27). При прохождении света через рабочую камеру он поглощается компонентами анализируемой пробы. Чем больше концентрация компонента в потоке подвижной фазы, тем больше падение интенсивности излучения, которое будет зарегистрировано фотоприемником.



Рис. 27. Схема фотометра с фиксированной длиной волны: 1 – фотоприемник (фотоумножитель); 2 – рабочая микрокювета; 3 – оптический фильтр; 4 – ртутная лампа; 5 – сравнительная микрокювета

При применении в качестве источника света ртутной лампы низкого давления, обладающей высокой стабильностью и долгим временем жизни (более 5000 ч), детектирование проводят на длине волны 254 нм, которой соответствует 90% энергии излучения. На этой длине волны высоким поглощением обладают многие органические соединения (ароматические, гетероциклические, кетоны и др.). В спектрофотометрических детекторах источником света служит дейтериевая лампа и необходимую спектральную полосу выделяют с помощью дифракционных решеток или интерференционных фильтров с заданной шириной спектральной полосы.

Широко используются также спектрофотометрические детекторы на фотодиодных линейках или на диодных матрицах, когда проба сканируется каждые несколько миллисекунд, т.е. спектральная информация выдается практически постоянно. Каждый диод (а их более 2000) в матрице предназначен для измерения узкой полосы (50 мкм) спектра. Детектор позволяет определять спектр каждого пика и вычислять максимальное поглощение.

В жидкостной хроматографии получили применение также флуориметрические детекторы, измеряющие флуоресценцию ана-

лизируемых веществ. Чувствительность флуориметров на два порядка выше чувствительности УФ-детекторов.

Работа электрохимических детекторов основана на определении электрохимических свойств соединений в потоке элюента. Большинство электрохимических детекторов работают в режиме, при котором поддерживается постоянное напряжение между двумя электродами, погруженными в поток элюента, и регистрируется зависимость силы тока от времени. Различают детекторы, которые реагируют либо на изменение свойств элюата, либо на конкретный компонент элюата [12]. К первому типу относится кондуктометрический детектор, принцип работы которого основан на измерении электропроводности элюата в зависимости от содержания в нем заряженных частиц. Ко второму типу относится амперометрический детектор, действие которого заключается в измерении электрического тока в ячейке, возникающего при окислении (восстановлении) регистрируемого вещества на поверхности рабочего электрода при подаче на него определенного напряжения. Этот детектор высокоселективен, поскольку не все вещества легко окисляются или восстанавливаются.

Рефрактометрические детекторы являются универсальными, они особенно полезны, когда вещества не имеют интенсивного поглощения в УФ свете, не флуоресцируют и не обладают электрохимической активностью. Их принцип действия основан на измерении показателя преломления чистого растворителя и раствора анализируемого вещества в этом растворителе. Вклад растворенного вещества в изменение показателя преломления растворителя пропорционален объемной концентрации этого вещества. При работе с рефрактометрическим детектором необходимо тщательно поддерживать температуру и не допускать пульсации потока (использовать демпфирующие устройства).

КАЧЕСТВЕННЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Целью проведения качественного хроматографического анализа является определение наименования компонентов, входящих в состав анализируемой смеси, или наличия или отсутствия интересующих аналитика компонентов.

Проведение качественного анализа зависит от того, насколько хорошо известен состав анализируемой смеси.

1. Состав смеси известен полностью.

В этом случае необходимо подтвердить или опровергнуть наличие определяемого компонента.

Для этого необходимо с помощью справочных данных по удерживанию или путем анализа эталонных соединений подобрать сорбент, разделяющий все компоненты смеси. Качественный анализ проводится путем сопоставления величин удерживания (время удерживания, фактор удерживания или индекс удерживания) для компонента смеси и эталонного соединения. Совпадение данных величин (т.е. наличие хроматографического пика с заданным значением величины удерживания) свидетельствует о наличии данного компонента в исследуемой смеси, несовпадение величин удерживания или отсутствие хроматографического пика с заданным значением величины удерживания – об отсутствии данного компонента в исследуемой смеси.

2. Состав смеси не известен, но известно происхождение.

В этом случае задача может решаться на уровне индивидуальной идентификации на основе известных корреляций удерживания от физико-химических свойств и структуры сорбатов.

3. Не известны ни состав, ни происхождение смеси.

В третьем случае необходимо проводить групповую идентификацию, а затем и индивидуальную.

Первые два случая качественного анализа объединяют понятием *подтверждающий анализ*, а третий случай называют *разведочный анализ*.

Для *групповой идентификации* применяют следующие приемы:

1. Реакционная газовая хроматография – совместное использование химических и хроматографических методов исследования в единой хроматографической системе. Типичные химические реакции, используемые в реакционной газовой хроматографии: гидрирование и дегидрирование, гидрогенолиз, дегидротация и дегидрогалогенирование, этерификация и декарбоксилирование, обмен функциональными группами между сорбатом и реагентом и другие реакции, приводящие к образованию соединений, отличающихся по удерживанию. Применяют также характерные реакции на выходе колонки, изменяющие окраску или поглощающие соединения различных классов.

2. Селективное детектирование – применение двух и более различных детекторов.

3. Фазовое равновесие анализируемой пробы в системе ограниченно смешивающихся растворителей, например, гексан – ацетонитрил, с последующим хроматографированием каждой из фаз на одной колонке.

3. Информация о зависимости I от T_C (ΔI при изменении T_C на 10-20°C).

4. Хроматографический анализ на колонках с неподвижными фазами различной полярности и получение многоэлементного спектра удерживания вида $(\Delta I_{i,1})_N = I_i - I_1$, где I_1 – индекс удерживания сорбата, принадлежащего к гомологическому ряду или группе соединений N , неполярной неподвижной фазы; I_i – индекс удерживания этого сорбата полярной неподвижной фазы ($i = 2, 3, 4, \dots, i$ – целые числа по числу используемых НФ); $(\Delta I_{i,1})_N$ – раз-

ность индексов, согласно правилу Ковача величина практически постоянная для гомологического ряда веществ (N) с определенной функциональной группой.

Для *индивидуальной идентификации* применяют следующие приемы:

1. Прямой метод, заключающийся в выделении хроматографических зон сорбатов и последующей их идентификацией независимыми методами, в том числе с использованием масс-спектрометрии и других методов.

2. Сравнение величин удерживания анализируемых компонентов с удерживанием компонентов эталонных смесей или со справочными данными и т.д.

3. Использование корреляционных зависимостей, связывающих величины удерживания сорбатов с их физико-химическими характеристиками, структурой и условиями эксперимента. $I = f(n_c, M, T_{кин}$ и т.д.).

4. Метод добавки индивидуальных веществ сравнения. Увеличение высоты соответствующего пика (без его расширения, т.е. $w_h = \text{const}$) по сравнению с высотой этого пика до введения эталона свидетельствует о присутствии в анализируемой смеси искомого вещества.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Целью проведения количественного хроматографического анализа является определение содержания компонентов, входящих в состав анализируемой смеси.

Причем целью анализа может быть как определение одного или небольшого числа компонентов смеси, так и определение каждого компонента в смеси (допускается суммарное содержание неразделенных компонентов).

Для количественного анализа используют следующие хроматографические сигналы:

h – высота пика (перпендикуляр, опущенный из максимума пика на продолжение нулевой линии);

Q – площадь пика, ограниченная его контуром и продолжением нулевой линии.

Для получения количественных результатов хроматографические сигналы интерпретируют различными методами.

Метод внутренней нормализации

Данный метод основан на определении соотношений между концентрациями компонентов смеси. При этом необходимым условием использования данного метода расчета является регистрация всех компонентов на хроматограмме. Преимущества метода состоит в том, что отсутствует необходимость вводить в пробу стандартное вещество.

Расчет состоит в приведении к 100% суммы хроматографических сигналов с учетом экспериментально определенных коэффициентов чувствительности детектора к исследуемым компонентам относительно стандартного вещества (бензола или бутана).

$$C_i = \frac{K_i Q_i}{\sum_i^N K_i Q_i},$$

где N – число пиков на хроматограмме; Q_i – площадь i -ого пика.

Если определяемые компоненты относятся к одному классу соединений, то коэффициенты чувствительности примерно одинаковы и выражение для расчета можно преобразовать к следующему виду:

$$C_i = \frac{Q_i}{\sum_i^N Q_i}.$$

Точность данного метода небольшая, поэтому его часто используют как способ предварительной оценки содержания компонента.

Метод абсолютной градуировки

Метод абсолютной градуировки заключается в определении зависимости сигнала детектора, выражаемого высотой или площадью хроматографического пика, от концентрации (в этом случае хроматографируют 3–5 смесей с разными концентрациями определяемого компонента) или количества определяемого компонента (в этом случае хроматографируют смесь с одинаковой концентрацией определяемого компонента, но 3–5 доз разного объема).

Градуировка – это экспериментальное или расчетное установление градуировочной характеристики.

Градуировочная характеристика – зависимость аналитического сигнала от содержания аналита, выраженная в виде формулы (градуировочная функция) или графика (градуировочный график).

Аналитический сигнал – физическая величина или комбинация физических величин, функционально связанная с содержанием аналита, и регистрируемая в ходе выполнения методики анализа. В хроматографии количественным аналитическим сигналом является высота или площадь пика.

Уравнение градуировки, полученное методом наименьших квадратов, имеет вид:

$$Q_i = a_i + b_i C_i,$$

где C_i – концентрация i -го компонента на входе хроматографа; a_i и b_i – коэффициенты корреляционного уравнения.

При малых значениях a_i , когда:

$$\frac{|a_i - 0|}{S_a} \leq t(P = 0,95; f = n - 1),$$

т.е. a_i незначимо отличается от нуля по t -критерию Стьюдента, уравнение градуировки вырождается в прямолинейную зависимость:

$$Q_i = b_i C_i,$$

где b_i – угловой коэффициент, равный тангенсу угла наклона.

Получив уравнение градуировочной характеристики хроматографа, определяют C_x анализируемых смесей по уравнению:

$$C_x = \frac{Q_x}{b_i}.$$

Метод абсолютной градуировки широко используется в случаях, когда число определяемых компонентов сравнительно невелико, а также при определении примесей и микропримесей. Точность метода зависит от постоянства параметров режима хроматографа, тщательности приготовления градуировочной смеси и воспроизводимости размера пробы.

Метод внешнего стандарта

В методе внешнего стандарта используют стандартный образец состава или градуировочную смесь с нормированным содержанием определяемого компонента, которую анализируют на хроматографе и сравнивают результаты анализа i -го компонента в исследуемой пробе.

$$C_i = \frac{Q_i}{Q_{(st)}} \cdot C_{i(st)}.$$

Метод внешнего стандарта является упрощением метода абсолютной градуировки, когда для определения градуировочного компонента используется не 3–5 стандартных смесей, а одна. Он более экспрессен, но менее точен по сравнению с методом абсолютной градуировки.

Метод внутреннего стандарта

Метод основан на введении в исследуемую смесь фиксированного количества стандартного вещества сравнения, относительно которого экспериментально определены коэффициенты чувствительности к исследуемым компонентам анализируемой смеси.

$$K_i = \frac{K'_i}{K'_{(st)}}.$$

Концентрацию i -го компонента определяют по уравнению при $K'_{(st)} = 1$.

$$C_i = K_i \frac{Q_i}{Q_{st}} r_{st},$$

где $r_{st} = W_{st}/W_{np}$ – количество стандартного вещества, отнесенное к количеству пробы без этого вещества.

Метод внутреннего стандарта позволяет проводить расчет содержания отдельных компонентов пробы даже при отсутствии на хроматограмме пиков других компонентов. Метод не требует постоянства размера пробы, так как на вход хроматографа поступает относительная величина C_i/C_{st} в пробе, а на выходе измеряется относительный сигнал Q_i/Q_{st} .

Трудность реализации метода заключается в выборе и точной дозировке стандартного вещества, физико-химические свойства которого должны быть близки к свойствам анализируемых компонентов смеси. Наибольшая точность будет при $\Delta t_R = (t_{R(i)} - t_{R(st)}) \rightarrow 0$, $\Delta K = (K_i - K_{st}) \rightarrow 0$ и $\Delta C = (C_i - C_{st}) \rightarrow 0$.

Метод двойного внутреннего стандарта

Данный метод разработан М.С. Вигдергаузом (1986 г.) и его отличие от метода внутреннего стандарта заключается в применении двух стандартных веществ, элюирующихся до и после i -го компонента (рисунок 28).

В этом случае концентрация C_i определяется по уравнению:

$$C_i = \sqrt{C_{i(st1)} \cdot C_{i(st2)}} = \sqrt{\left(\frac{K_i Q_i}{K_{st1} Q_{st1}} r_{st1} \right) \left(\frac{K_i Q_i}{K_{st2} Q_{st2}} r_{st2} \right)}$$

или

$$\frac{C_i}{\sqrt{r_{st1} r_{st2}}} = \frac{K_i}{\sqrt{K_{st1} K_{st2}}} \cdot \frac{Q_i}{\sqrt{Q_{st1} Q_{st2}}}$$

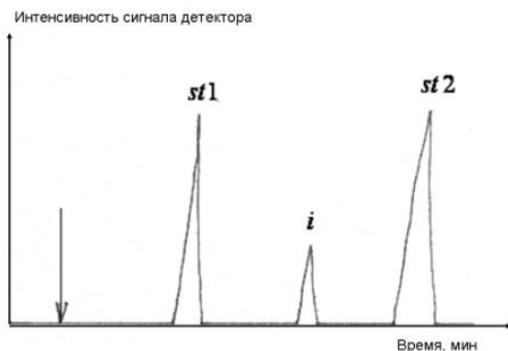


Рис. 28. Иллюстрация к методу двойного внутреннего стандарта

Если свойства стандартов близки к свойствам исследуемых компонентов, то $\frac{K_i}{\sqrt{K_{st1} K_{st2}}} \approx 1$.

Применение метода двойного внутреннего стандарта обеспечивает повышение точности измерения концентраций за счет взаимной компенсации случайных и систематических составляющих погрешности измерения при одновременном хроматографировании исследуемых и стандартных веществ.

Метод добавки

Метод используется, если отсутствует возможность выбора подходящего стандартного вещества, который регистрировался бы в виде отдельного пика. При этом анализ проводится дважды: без добавки и с добавкой стандартных веществ, которые входят в со-

став исследуемой смеси. Расчет производят из двух хроматограмм по уравнению:

$$C_i = \frac{Q_i' r_D}{\frac{Q_{(i+D)}'' \cdot Q_K'}{Q_K''} - Q_i'}$$

где Q_K – сигнал «пересчетного» вещества, присутствующего в смеси; величина с одним штрихом определена из хроматограммы смеси без добавки; с двумя штрихами – из хроматограммы с добавкой вещества, присутствующего в смеси, $r_D = W_D / W_{np}$ – количество добавляемого вещества, отнесенное к количеству пробы без этого вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хроматография – совсем молодая наука, но за 110 лет своего существования она прошла такой путь, какой другие дисциплины проходят за несколько столетий: в этом смысле хроматография – это истинное дитя бурного двадцатого века. Хроматографический метод стал настолько популярен, что уже давно перешагнул за пределы химической, аналитической и научно-исследовательской лаборатории. Теперь трудно представить себе современную медицинскую и биологическую аналитическую лабораторию без хроматографа. Хроматограф стал все чаще появляться в цехах химических, биохимических, пищевых, парфюмерных, фармацевтических и других производств для контроля процесса и его регулировки.

Золотой век хроматографии продолжается, и еще долгое время она будет обогащать наши знания об окружающем мире, служить прогрессу человечества.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Вигдергауз М.С. Цветопись. – М.: Химия, 1980. – 98 с.
2. Байбуртский Ф. Хроматография – простой способ анализа сложных веществ // Наука и жизнь. – 1998. – №2. – С. 25-27.
3. Даванков В.А., Онучак Л.А., Буланова А.В., Егорова К.В., Арутюнов Ю.И. Номенклатура в хроматографии: Основные понятия. Терминология. Термодинамические характеристики сорбционного процесса. – Самара: Из-во «Самарский университет», 1996. – 35 с.
4. Гольберт К.А., Вигдергауз М.С. Введение в газовую хроматографию. – М.: Химия, 1990. – 352 с.
5. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. – М.: Мир, 1965. – 508 с.
6. Нобелевские лауреаты по литературе, медицине, химии, физике, экономике и мира с 1901 по 2016 год <http://www.nobeliat.ru/>
7. Тесаржик К., Комарек К. Капиллярные колонки в газовой хроматографии. – М.: Мир, 1987. – 223 с.
8. Яшин Я. И., Яшин А. Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2003. – т. XLVII. – № . 1. – С. 64-80.
9. Яшин Я.И., Яшин Е.Я., Яшин А.Я. Газовая хроматография. – М.: Издательство «ТрансЛит», 2009. – 528 с.
10. Баффингтон Р., Уилсон М. Детекторы для газовой хроматографии. – М.: Мир, 1993. – 80 с.
11. Стыскин Л.Е., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. – М., 1986. – 213 с.

12. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В., Филипов А.А., Селемьнев В.Ф., Приданцев А.А. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. – Воронеж: Изд-во «Водолей», 2004. – 528 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Суть хроматографического процесса.....	4
Открытие и развитие хроматографии	9
Основные понятия и классификация хроматографических процессов.....	35
Теоретические основы хроматографии	44
Аппаратурное оформление хроматографического процесса..	53
Источник подвижной фазы	54
Узел ввода пробы.....	56
Хроматографическая система разделения.....	59
Детекторы.....	65
Качественный хроматографический анализ.....	81
Количественный хроматографический анализ	84
Метод внутренней нормализации	84
Метод абсолютной градуировки	85
Метод внешнего стандарта	87
Метод внутреннего стандарта	87
Метод двойного внутреннего стандарта	88
Метод добавки	89
Заключение	91
Библиографический список.....	92

Учебное издание

*Платонов Игорь Артемьевич,
Новикова Екатерина Анатольевна,
Платонов Владимир Игоревич*

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Учебное пособие

Редактор И.П. Ведмидская
Компьютерная вёрстка А.В. Ярославцевой

Подписано в печать 30.04.2021. Формат 60×84 1/16.

Бумага офсетная. Печ. л. 6,0.

Тираж 120 экз. (1-й з-д 1-25). Заказ № 84.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.П. КОРОЛЕВА»
(САМАРСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)
443086 Самара, Московское шоссе, 34.

Издательство Самарского университета.
443086 Самара, Московское шоссе, 34.

