

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до вивчення курсу

Хроматографічні методи розділення органічних сполук

Для студентів спеціальності
“Хімічна технологія органічних речовин”

Київ
2008

Методичні вказівки до вивчення курсу “Хроматографічні методи розділення органічних сполук” для студентів спеціальності “Хімічна технологія органічних речовин”.
Укладачі: О.Г.Юрченко, В.М.Родіонов. - К.: ІВЦ “Видавництво «Політехніка»”, 200_. - 130 с.

На в ч а л ь н е в и д а н н я

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до вивчення курсу

**Хроматографічні методи розділення
органічних сполук**

для студентів спеціальності
“Хімічна технологія органічних речовин”

Укладачі: *Юрченко Олександр Григорович*, д-р хім. наук, проф.,
Родіонов Володимир Миколайович, канд. хім. наук, доц.

Відповідальний
редактор

Рецензент

За редакцією укладачів

ВСТУП

В результаті проведення хімічної реакції у колбі або промислового реакторі в абсолютній більшості випадків утворюється суміш речовин, яка окрім цільових продуктів може містити розчинники, вихідні речовини та продукти побічних реакцій. У кожному випадку потрібно знати склад суміші, наприклад, для оптимізації умов проведення процесу. Досліднику потрібно виділити з часто складної суміші головний та побічні продукти реакції для їх ідентифікації. Важливим завданням є визначення чистоти отриманого продукту, наявність у ньому основної речовини та домішок. Неоцінимою допомогою у всіх цих випадках надають хроматографічні методи аналізу та препаративного розділення сумішей.

У даних методичних вказівках викладені базові принципи теорії хроматографічного процесу та хроматографічної колонки, практичні аспекти аналітичного та препаративного розділення сумішей органічних сполук методами колон очної хроматографії та хроматографії на площині. З інструментальних методів більш детально розглянуті газо-рідинна та вискоефективна рідинна хроматографія. Ці методи внаслідок високого ступеня автоматизації процесу розділення та реєстрації результатів експерименту, стандартизації та промислового виробництва апаратури, носіїв та нерухомих фаз стали рутинними в учбових, дослідницьких та заводських лабораторіях.

Курс “Хроматографічні методи розділення органічних сполук” викладається студентам спеціальності “Хімічна технологія органічних речовин”.

1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ РОЗДІЛЕННЯ СУМІШЕЙ ТА ВСТАНОВЛЕННЯ ІНДИВІДУАЛЬНОСТІ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

Розділення сумішей органічних сполук можливе через різницю хімічних або фізичних властивостей.

1.1. Різниця в хімічних властивостях компонентів суміші використовується для їх розділення як в лабораторії, так і в промисловості. Наприклад, виділення з продуктів коксування кам'яного вугілля піридинових основ і фенолів базується на їх здатності утворювати розчинні у воді солі з кислотами та лугами відповідно. Ізобутилен з суміші олефінів виділяють сірчанокислотою гідратацією. В цю реакцію ізобутилен вступає в найбільш м'яких умовах. В лабораторній практиці альдегіди із сумішей виділяють через адукти з бісульфітом натрію.

1.2. Різниця в розчинності. Якщо дві речовини мають різну розчинність в якому-небудь розчиннику, то розділити їх можна наступними методами:

а) при дуже великій різниці в розчинності більш розчинну сполуку можна просто відмити від менш розчинної (екстракція);

б) якщо розчинності близькі при кімнатній температурі, але сильно розрізняються при підвищеній, то менш розчинну сполуку можна виділити фільтруванням гарячого розчину;

в) якщо при підвищеній температурі розчинність двох речовин близька, а при кімнатній розрізняється, то важкорозчинну на холоді речовину можна виділити після розчинення суміші при підвищеній температурі і кристалізації при пониженій температурі. Якщо різниця розчинностей компонентів суміші невелика і при пониженій температурі, то остаточного розділення можна досягти дробною кристалізацією.

1.3. Різниця в пружності пари використовується в різного виду перегонках:

а) при дуже великій різниці в пружності пари використовується відгонка легкої сполуки (відгонка розчинника);

б) при середній різниці в пружності пари проводиться фракційна перегонка (з дефлегматором);

в) при дуже малій різниці в пружності пари проводять ректифікацію на ефективній колонці.

1.4. Різниця в коефіцієнтах розподілу між двома рідинами, що не змішуються, дозволяє розділити суміш сполук методом екстракції (періодичної, безперервної або протиструменевої), а також методом розподільчої хроматографії.

1.5. Різниця в здатності адсорбуватися з розчину використовується при очистці розчинів від домішок смолистих сполук шляхом адсорбції на активованому вугіллі або на інших адсорбентах, а також за допомогою адсорбційної хроматографії.

2. КРИТЕРІЇ ІНДИВІДУАЛЬНОСТІ ТА ІДЕНТИЧНОСТІ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

2.1. Впевнитись, що речовина індивідуальна, тобто складається з молекул одного виду, можна в процесі її очистки. При цьому після кожної операції очистки вимірюють фізичні показники речовини, доки вони не стануть постійними. Наприклад, кристалічну речовину перекристалізують до тих пір, поки її температура топлення не стане постійною, причому бажано кристалізацію проводити з декількох розчинників. Для рідин досягають постійних значень температури кипіння та показника заломлення. В загальному випадку визначають максимальну кількість фізичних констант і домагаються їх постійних значень в ході очистки. Методи очистки можуть бути як фізико-хімічними, так і чисто хімічними.

2.2. Встановлення ідентичності сполуки. Найкращий спосіб встановлення структури органічної сполуки – пряме порівняння її властивостей з властивостями зразка, хімічна будова якого достовірно відома, причому необхідно порівнювати якомога більше число показників. Наприклад, якщо дві речовини мають однакову температуру топлення а їх суміш плавиться на 10-20⁰ нижче – речовини безсумнівно різні. Якщо суміш має таку ж температуру топлення, що й індивідуальні компоненти, то це ще не означає, що вони без сумніву ідентичні.

Найбільш повним критерієм ідентичності двох сполук є повний збіг всіх доступних для виміру характеристик речовини. Однак практично достатньо надійним критерієм ідентичності є збіг в деталях ІЧ спектрів двох сполук, знятих в однакових умовах, їх спектрів ЯМР або мас-спектрів.

3. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ОСНОВИ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ПРОЦЕСУ

3.1. Основні поняття

Хроматографія – фізико-хімічний метод розділення рідких або газоподібних сумішей, що базується на різній сорбції компонентів цих сумішей з рухомої фази, що рухається відносно сорбенту (нерухомої фази).

Сорбція – поглинання газів, пари або розчинених речовин (сорбатів) твердими або рідкими поглиначами (сорбентами). Зворотній процес називають **десорбцією**. Розрізняють **адсорбцію**, **абсорбцію** і **хемосорбцію**.

Адсорбція – концентрування речовини (**адсорбату**) на межі розподілу фаз, що викликане фізико-хімічною взаємодією адсорбату з поверхнею. Речовину, що адсорбує, називають **адсорбентом**. Переважна більшість адсорбентів – тверді речовини, і в цьому випадку адсорбція відбувається на межі тверде тіло – газ або тверде тіло – рідина.

Абсорбція – поглинання речовини (**абсорбату**) з розчину або газової фази рідиною або твердим тілом (**абсорбентом**) в об'ємі. Переважна більшість абсорбентів – рідини.

Хемосорбція – сорбція, що супроводжується хімічною реакцією.

3.2. Класифікація хроматографічних методів

В табл. 1.1 наведена класифікація хроматографічних методів розділення, виходячи з визначення трьох варіантів сорбції.

- З таблиці можна зробити висновок, що за технікою виконання в хроматографії можна виділити три основні хроматографії на площині (в тонкому шарі та паперова).

Кожен із цих методів може використовувати сорбенти, механізм дії яких відрізняється (при одному і тому ж способі проведення та апаратурному оформленні).

Таблиця 1.1.

Класифікація хроматографічних методів

Тип сорбції	Тип хроматографії	Назва хроматографічного методу	Система сорбент-середовище	Техніка виконання розділення
А д с о р б ц і я	Молекулярна	Адсорбційна рідинна хроматографія	Тверда фаза-рідина	Колоночна за високого та низького тиску. В тонкому шарі на площині.
		Гель-фільтрування та Гель-проникнення	Тверда фаза- вода або органічний розчинник	Колоночна за високого та низького тиску.
	Іонообмінна	Адсорбційна газова хроматографія	Тверда фаза-газ	Колоночна за підвищеного тиску.
		Іонообмінна хроматографія	Тверда фаза-рідина	Колоночна за високого та низького тиску. В тонкому шарі на площині.
		Іон-парна хроматографія	Те ж	Те ж
А б с о р б ц і я	Тільки молекулярна	Розподільча рідинна хроматографія	Рідина-рідина	Колоночна за низького тиску. В тонкому шарі на площині. На папері.
		Розподільча газо-рідинна хроматографія	Рідина-газ	Колоночна за підвищеного тиску. Капілярно-колоночна

3.3. Явища, на яких базуються хроматографічні методи

3.3.1. Адсорбція

Фізико-хімічною основою адсорбції є різниця у властивостях часточок адсорбенту, що знаходяться на поверхні і в об'ємі. На відміну від урівноважених часточок всередині масиву, поверхневі часточки неурівноважені і здатні взаємодіяти з газовим або рідким середовищем, що прилягає до поверхні, а також з молекулами різних речовин, що розчинені в цьому середовищі. Чим більша спорідненість молекул адсорбатів до адсорбенту, тим сильніша взаємодія адсорбату з адсорбентом. Існує три основних типи міжмолекулярних сил, від яких залежить утримання компонентів, що розділяються:

- іонні сили – катіон-аніонна взаємодія (іонообмінна хроматографія);
- полярні сили – виникають в результаті взаємодії молекул, що вже є полярними або легко поляризуються у вигляді постійних або наведених диполів;
- дисперсійні сили – виникають в результаті деформації електронних хмар між молекулами, що слабо поляризуються (вуглеводні).

В кожному з варіантів розглянутої вище класифікації можна використовувати ту чи іншу рушійну силу процесу розділення.

Кількісною характеристикою процесу адсорбції газів або розчинених речовин є ізотерма адсорбції – залежність питомої кількості речовини, адсорбованої даним адсорбентом, від концентрації його в розчині або газовій фазі за умови встановлення рівноваги при постійній температурі (рис. 3.1).

Для лінійної ізотерми (рис. 3.1, а) кількість адсорбованої речовини пропорційна її концентрації в рухомій фазі:

$$T = kC, \quad (3.1)$$

де k - константа, що відображає енергію взаємодії адсорбату з адсорбентом.

На практиці лінійні ізотерми зустрічаються рідко, тільки як початкова ділянка інших, нелінійних ізотерм. Із зростанням концентрації адсорбату в рухомій фазі зростає кількість його молекул на поверхні адсорбенту, що все більше заповнюється. В найпростішому вигляді цьому процесу відповідає ізотерма Фрейндліха (рис. 3.1, б), що описується наступним рівнянням:

$$T = kC^n, \quad (3.2)$$

де k та n - константи.

Адсорбція речовини на однорідній поверхні поділу фаз в найпростішому випадку підпорядковується ізотермі Ленгмюра (рис. 3.1, в), причому однорідною вважається поверхня, на будь-яких ділянках якої енергія адсорбції однієї і тієї ж речовини однакова:

$$T = T_{\max} \frac{kC}{1 + kC}, \quad (3.3)$$

де T - кількість молів речовини, що адсорбувалася на 1 см^2 поверхні адсорбенту; T_{max} - гранична кількість молів речовини, що адсорбувалася на 1 см^2 поверхні адсорбенту при одношаровому заповненні поверхні; k - адсорбційний індекс або здатність речовини адсорбуватися, $\text{см}^3/\text{моль}$.

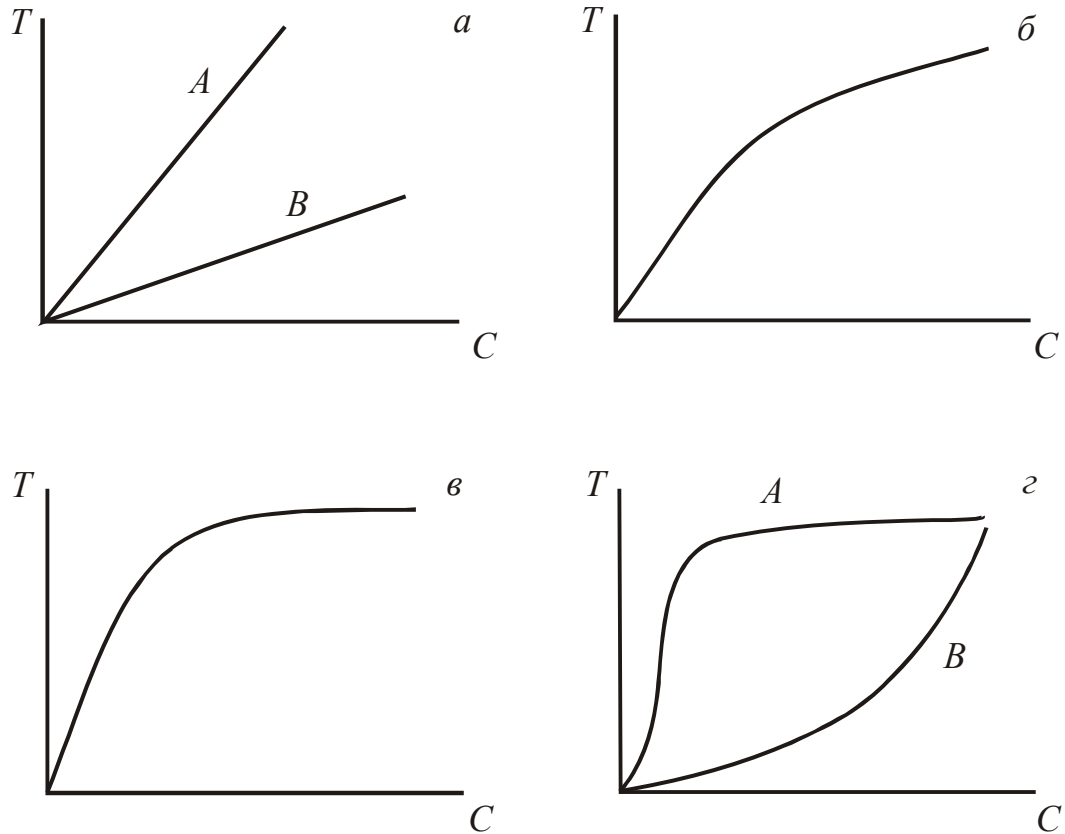


Рис.3.1. Ізотерми адсорбції: *a* – лінійна ізотерма; *б* – ізотерма Фрейндліха; *в* - ізотерма Ленгмюра; *г* - S-подібна (A) та ввігнута (B) ізотерми.

Виходячи з рівняння ізотерми Ленгмюра частка поверхні, зайнята адсорбатом, визначається з наступного рівняння:

$$\theta = \frac{T}{T_{\text{max}}} = \frac{kC}{1 + kC} \quad (3.4)$$

З рівняння (3.3) виходить, що існує межа адсорбції, коли подальше зростання концентрації адсорбату не призводить до зростання адсорбції, в той час як при дуже малих концентраціях адсорбату в рухомій фазі залежність лінійна.

Нерідко зустрічаються випадки, коли молекули речовини, що знаходяться в адсорбованому стані, взаємодіють між собою, при цьому взаємне притягання адсорбованих молекул призводить до збільшення адсорбції і навпаки. Ефект взаємодії адсорбованих молекул тим більший, чим вищий ступінь заповнення ними поверхні. В цьому випадку ізотерма адсорбції може мати ввігнуту (рис. 3.1, *г* (B)) або S-подібну форму (рис. 3.1, *г* (A)). Останній відповідає рівняння

$$kC = \frac{\theta}{1-\theta} \exp(-2\gamma\theta), \quad (3.5)$$

де γ - атракційний фактор (якщо $\gamma > 0$, то адсорбовані молекули притягуються, і навпаки).

Оскільки адсорбція є рівноважним процесом і супроводжується десорбцією, лінійна ізотерма дає можливість оцінити швидкість десорбції по тангенсу кута нахилу прямої. Чим більше значення константи k , тим менше швидкість десорбції, тим сильніше утримується речовина на поверхні адсорбенту.

Для нелінійної адсорбції відповідну ізотерму визначають з експериментальних даних, привівши її рівняння до рівняння прямої лінії, наприклад:

$$\ln T = \ln k + n \ln C, \quad (3.6)$$

або

$$\frac{1}{\theta} = 1 + \frac{1}{kC}. \quad (3.7)$$

Оскільки тільки часточки поверхневого шару адсорбенту приймають участь у взаємодії з адсорбатом, то надзвичайно важливе значення набуває пористість адсорбенту, чим більша пористість, тим вищі його адсорбційні властивості. Необхідно також, щоб розмір пор адсорбенту був більший за розмір часточок, що адсорбуються на його поверхні, в противному разі адсорбуватися будуть тільки порівняно невеликі часточки, що мають доступ до значної частини поверхні адсорбенту. Це явище, небажане в практичній роботі із звичайними адсорбентами, спеціально використовується при розділенні речовин за молекулярною масою.

Явище адсорбції використовується в органічній хімії і промисловості для освітлення розчинів (адсорбція на дрібнодисперсних адсорбентах, що вносяться ззовні, або утворюються в розчині при коагуляції білків і т.п.), знебарвлення розчинів (кип'ятіння з активованим вугіллям), адсорбція з розчинів окремих речовин, сушка газів (ангідрон в елементному аналізі, цеоліти в промисловості), очистка газів від домішок (застосування активованого вугілля в протигазах).

3.3.2. Абсорбція

Явище абсорбції краще всього проілюструвати на конкретному прикладі. Якщо розчин речовини А в розчиннику 1 струнути з розчинником 2, котрий не змішується з розчинником 1, але розчиняє речовину А, то остання розподілиться між обома розчинниками, а відношення концентрацій прийме значення, що залежить від властивостей обох розчинників і природи розчиненої речовини. Робота переносу моля речовини з фази з концентрацією C_1 в фазу з концентрацією C_2 виражається рівнянням:

$$A = RT \ln \frac{C_2}{C_1}. \quad (3.8)$$

В умовах рівноваги ця робота визначається лише різницею хімічних потенціалів речовини в обох фазах і є функцією тільки температури. При постійній температурі

$$\frac{C_2}{C_1} = \text{const} = K_p, \quad (3.9)$$

де K_p - константа розподілу, а вираз (3.9) – закон розподілу Нернста.

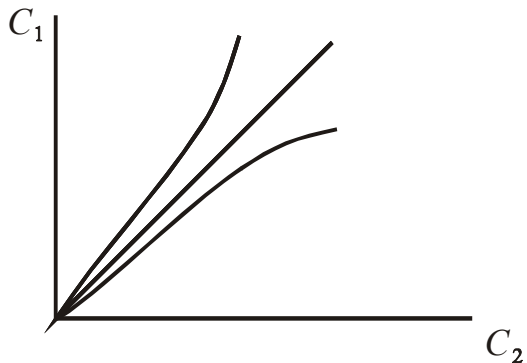


Рис. 3.2. Ізотерми абсорбції.

Константа K_p залишається постійною лише в ідеальних випадках в розведених розчинах. В концентрованих розчинах рівновага залежить також від процесів асоціації і дисоціації і описується ізотермами абсорбції, що являють собою залежність концентрації речовини в одній фазі по відношенню до його концентрації в другій фазі (рис. 3.2.)

3.3. Теорія хроматографічної колонки

Хроматографічною колонкою є стовпчик нерухої фази (НФ) (адсорбенту або абсорбенту, закріпленого на інертному носіїві), вздовж якого рухається рідка або газоподібна рухома фаза (РФ). В верхній шар сорбенту поміщають речовину або суміш речовин, які за рахунок процесів сорбції розподіляються між рухомою та нерухою фазами. Внаслідок руху рухої фази вздовж шару сорбенту речовина переноситься вздовж колонки, вступає в контакт з новою ділянкою сорбенту і сорбується, а речовина, сорбована попередньою ділянкою сорбенту, вступає в контакт з новою порцією рухої фази і десорбується. Таким чином, в процесі хроматографії відбувається перенос речовини з однієї фази в іншу (сорбція-десорбція), а також рух речовини (сорбату) вздовж шару сорбенту.

Завданням теорії хроматографічної колонки є встановлення законів цього руху. Існуючі теорії розглядають процес хроматографії з різних позицій, проте всі вони базуються на характері ізотерми сорбції речовини, що хроматографується на вибраному сорбенті, а також швидкості встановлення стану міжфазової рівноваги. Перше визначає статику сорбції, друге – кінетику.

В залежності від характеру ізотерми сорбції, яка може мати прямолінійний або криволінійний характер (рис. 3.1), розрізняють лінійну і нелінійну хроматографію.

Теорія лінійної хроматографії розглядає такі процеси, в яких розподіл речовини між фазами описується лінійною ізотермою і, отже, підкоряється закону Генрі. В такому процесі розподіл концентрації речовини в хроматографічній зоні симетричний відносно ординати, що відповідає максимальній концентрації.

Теорія нелінійної хроматографії розглядає процеси, що характеризуються випуклою або ввігнутою ізотермою сорбції і, отже, не підкоряються закону Генрі. Такі процеси призводять до асиметричного розподілу концентрації речовини в хроматографічній зоні.

Теорія рівноважної (ідеальної) хроматографії ґрунтується на припущенні, що рівноважний розподіл речовини між фазами встановлюється миттєво, тобто припускає, що швидкість доставки речовини з об'єму рухомої фази до поверхні нерухомої фази, а також проникнення речовини всередину нерухомої фази нескінченно велика. Вона також не враховує додаткового розмивання внаслідок звичайної молекулярної дифузії. Теорія дозволяє знайти закони переміщення центру хроматографічної зони.

Теорія нерівноважної (неідеальної) хроматографії розглядає реально існуючий процес, в якому швидкість встановлення рівноваги кінцева.

Рис. 3.3 дає наочну уяву про те, як розподіляється концентрація речовини в хроматографічній зоні в залежності від лінійності ізотерми сорбції двох речовин, що хроматографуються, а також швидкості встановлення рівноваги.

3.4.1. Рівноважна хроматографія

Припускаючи, що в колонці одиничного перерізу, рівновага між рухомою та нерухомою фазами встановлюється миттєво, поздовжня дифузія відсутня, швидкість руху речовини по шару сорбенту, тобто швидкість руху хроматографічної зони, описується виразом:

$$U_c = \frac{\alpha'}{\Gamma' + 1}, \quad (3.10)$$

де α' - лінійна швидкість рухомої фази в живому, тобто незайнятому сорбентом, перерізі колонки:

$$\alpha' = \frac{\omega}{S\chi}, \quad (3.11)$$

де ω - об'ємна швидкість рухомої фази; S - площа поперечного перерізу колонки; χ - частка об'єму колонки, зайнята нерухомою фазою; $\Gamma' = V_{\text{НФ}}/V_{\text{РФ}}$ - частковий коефіцієнт Генрі, відношення сорбційних ємностей нерухомої та рухомої фаз.

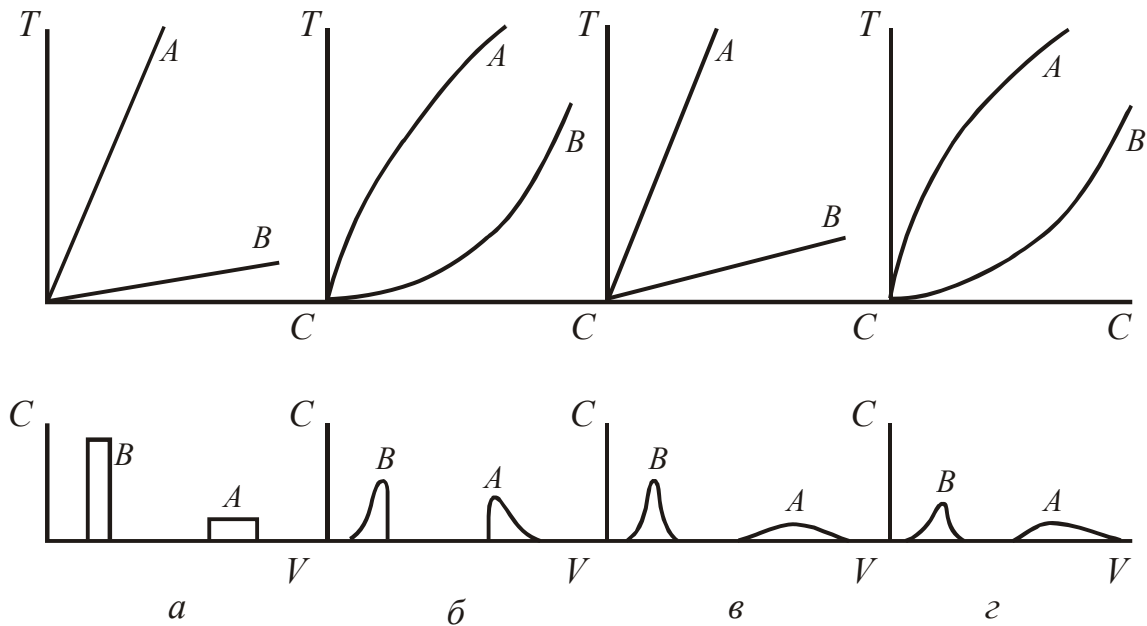


Рис. 3.3. Форми ізотерм сорбції і відповідні їм контури зон згідно з різними теоріями хроматографії: *a* – лінійна ідеальна; *б* – нелінійна ідеальна; *в* – лінійна неідеальна; *г* – нелінійна неідеальна.

Таким чином, у випадку лінійної рівноважної хроматографії рух зони речовини відбувається з постійною у часі і по перерізу шару швидкістю (див. рис. 3.3, *a*). Розділення суміші при достатній довжині шару сорбенту в колонці забезпечується різницею коефіцієнтів Генрі (різною швидкістю руху зон концентрації кожного з компонентів суміші вздовж шару сорбенту):

$$\Gamma'_i = \frac{kRT}{M_i} \quad \text{або} \quad \Gamma'_i = \frac{K_p RT}{M_i}, \quad (3.12)$$

де k та K_p - тангенс кута нахилу ізотерми; M_i - мольна частка досліджуваної речовини.

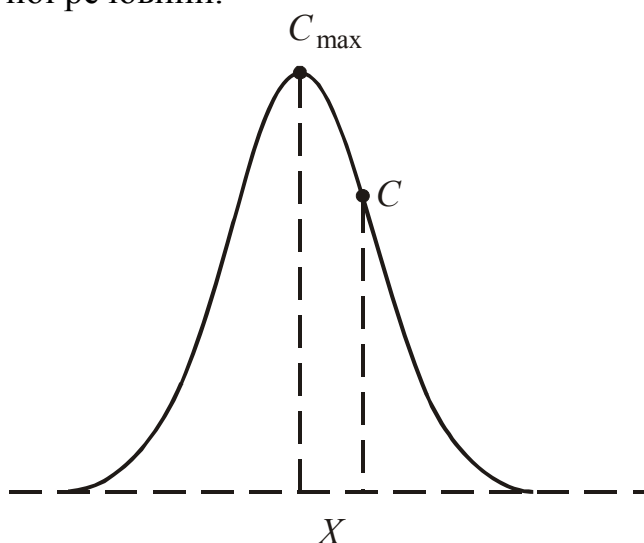


Рис. 3.4. Розподіл концентрації вздовж хроматографічної зони.

Ідеалізована картина лінійної рівноважної хроматографії ускладнюється за рахунок дифузії молекул сорбату в рухомій фазі, яка призводить до розширення хроматографічної зони. При цьому концентрація сорбату C в точці, віддаленій на відстань X від центру зони (рис. 3.4), визначається виразом:

$$C = C_{\max} e^{-\frac{X^2}{4Dt}}, \quad (3.13)$$

де D – коефіцієнт молекулярної дифузії; t – час від початку дифузії.

Враховуючи, що в рухомій фазі знаходиться не вся кількість речовини, а лише її частина, що дорівнює $1/(\Gamma' + 1)$, і вважаючи абсцису точки, що відповідає максимальній концентрації, нерухомою і рівною X_0 , то рівняння (3.13) прийме вигляд:

$$C = C_{\max} e^{-\frac{(X-X_0)(\Gamma'+1)}{4Dt}}. \quad (3.14)$$

Таким чином, в умовах лінійної рівноважної хроматографії з урахуванням існуючої поздовжньої дифузії розподіл концентрації в зоні підкоряється рівнянню (3.13) і відповідає гаусівському розподілу. Швидкість руху центру зони, що відповідає максимальній концентрації, постійна для даної речовини по всій довжині шару і визначається рівнянням (3.10). Картина розподілу відповідає хроматограмі, наведеній на рис. 3.3, в.

3.4.2. Нерівноважна хроматографія

В колонках, заповнених зернистим сорбентом, розмивання або дисперсія хроматографічної зони прямо пропорційно залежить від ефективності колонки, яка визначається для кожного компонента з хроматограми. Для спрощення уявлень про процеси, що мають місце в набивній колонці, заповненій зернистим сорбентом, застосовують *теорію тарілок*. Згідно з цією теорією, шар сорбенту уявно розбивається на ряд послідовних елементарних ділянок – “тарілок”, а речовина, що хроматографується, проходить кожну тарілку перервними порціями, які переносяться рухомою фазою. Теоретична тарілка – це ділянка колонки на якій між НФ та РФ встигає відбутись повний тепло- і масообмін. Кожна нова порція РФ, що подається на першу тарілку, приводить до нового розподілу речовини між НФ та РФ, причому частина речовини переноситься на наступну тарілку, де відбувається подібний процес. В результаті такого переміщення та перерозподілу речовина, що хроматографується, виявляється на декількох тарілках, причому на середніх її концентрація максимальна в порівнянні з крайніми. Таким чином речовина розмивається на декількох тарілках, причому чим більшу кількість тарілок займає речовина, тим сильніше розмивання. Отже, число тарілок, яке займає даний компонент, служить *мірою ефективності колонки*.

Число тарілок колонки вираховується за рівнянням:

$$N = 4 \left(\frac{y}{x} \right)^2, \quad (3.15)$$

де y - характеристика утримування - відстань від моменту вводу проби до моменту виходу максимуму піка; x - ширина піка в так званому “золотому перерізі”, тобто на 0,607 його висоти.

Оскільки ефективність колонки залежить від її довжини, колонки як правило порівнюють по певній якості, віднесеній на одиницю довжини. Як

порівняльна величина прийнята висота, еквівалентна теоретичній (тобто уявній) тарілці (ВЕТТ):

$$H = L/N \quad (3.16)$$

ВЕТТ – це довжина шару сорбенту, що необхідна для встановлення рівноваги між речовиною, що знаходиться в рухомій рідкій або газовій фазі та нерухомій твердій або рідкій фазі (виражається в одиницях довжини).

Зв'язок між ВЕТТ та швидкістю рухомої фази описується відомим рівнянням Ван-Деемтера:

$$H = A + B/U + CU, \quad (3.17)$$

де A , B та C – константи.

Кожен член цього рівняння описує вклад певного процесу розмивання хроматографічної зони. В спрощеному рівнянні (3.17) цих процесів всього три.

Вихрова дифузія. В набивній колонці молекули речовини і рухомої фази рухаються вздовж шару зернистого сорбенту не паралельно осі колонки, а самими різноманітними шляхами (рис. 3.5, а, б).

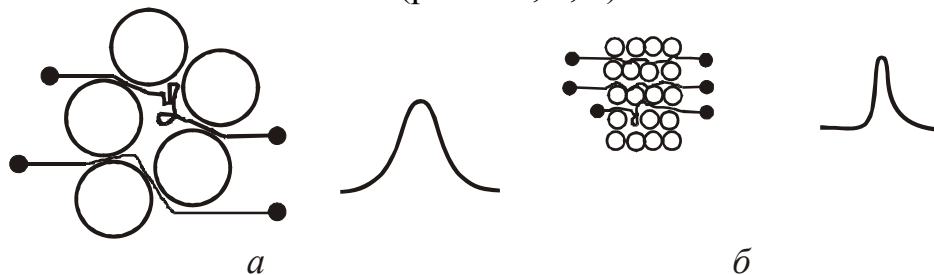


Рис. 3.5. Розмивання хроматографічної зони внаслідок вихрової дифузії та його залежність від розміру зерен сорбенту.

Траєкторії руху одних молекул будуть коротші, ніж у більшості, інших – довші. Ті молекули, сумарні траєкторії руху котрих всередині колонки виявляться коротшими, вийдуть з колонки раніше, ніж максимум концентраційного профілю, і навпаки. В результаті відбувається розмивання хроматографічної зони. Окрім того, величина ефективного коефіцієнта вихрової дифузії прямо пропорційна діаметру зерна сорбента. Чим крупніші зерна, тим менш щільна їх упаковка і тим більше розмивання хроматографічної зони через вихрову дифузію. Через те, що шлях не залежить від швидкості руху, в рівнянні (3.17) цей вклад виражається вільним членом A .

Поздовжня дифузія. Якщо деякий компонент з певною концентрацією помістити всередину заповненої рідиною або газом трубки, то він буде повільно дифундувати в напрямку обох кінців трубки. Спочатку розподілення концентрації буде гаусівським з максимумом концентрації в центрі зони, але з часом концентрація вирівнюється по всій довжині трубки. Кінцева стадія ніколи не реалізується в хроматографії, але початкова стадія присутня як в ідеальній нерівноважній, так і в реальній хроматографії і називається поздовжньою дифузією. Очевидно, що розмивання повинно бути пропорційне часові перебування компоненту в рухомій фазі, отже якщо рухома фаза протікає че-

рез колонку з лінійною швидкістю U , то вклад поздовжньої дифузії зворотно пропорційний величині U , тобто дорівнює B/U .

Опір масопередачі та динамічна дифузія. В процесі руху хроматографічної зони компоненту вздовж шару адсорбенту його молекули постійно переносяться з рухомої в нерухому фазу і навпаки. Цей процес відбувається з кінцевою швидкістю. Молекули, що знаходяться поблизу поверхні НФ переносяться або проникають в неї майже миттєво (так звана **внутрішня дифузія**). Ті ж з молекул, що знаходяться на великій відстані, можуть потрапити в нерухому фазу через значно більший проміжок часу, який включає в себе час доставки часточки з об'єму до поверхні НФ (так звана **зовнішня дифузія**). В результаті такого сповільненого переносу частини молекул через РФ відбувається розмивання хроматографічної зони, що носить назву розмивання через опір масопередачі.

З гідродинаміки відомо, що розподіл швидкостей руху РФ по перерізу порожньої циліндричної труби описується параболою з максимумом, що відповідає осі труби. Внаслідок цього в капілярній колонці відбувається додаткове розмивання хроматографічної полоси, пов'язане з так званою **динамічною дифузією**. У колонці, заповненій зернистим сорбентом, опір потоку РФ поблизу стінок менший, ніж у центрі перерізу. Такий нерівномірний розподіл концентрацій по перерізу викликає поперечний дифузійний потік та пов'язане з ним розмивання зони. Це явище отримало назву **стінкового ефекту**. Опір масопередачі та динамічна дифузія прямо пропорційні лінійній швидкості РФ, тобто є третьою складовою рівняння (3.17).

На рис. 3.6 представлено графічне зображення рівняння (3.17). Мінімум на сумарній кривій відповідає оптимальній швидкості РФ для даної хроматографічної системи.

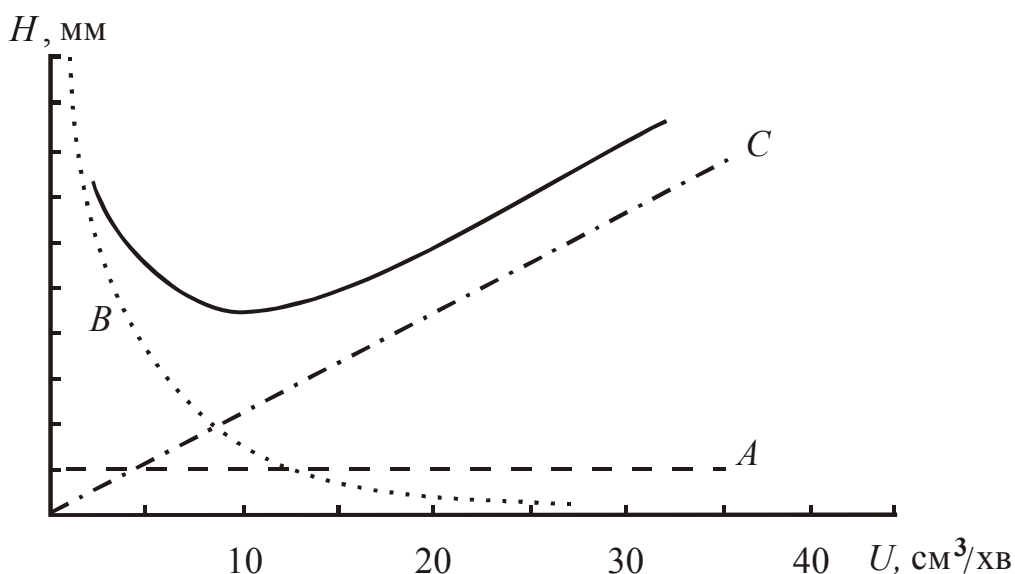


Рис. 3.6. Графік залежності висоти, еквівалентної теоретичній тарілці, від швидкості рухомої фази.

В газовій, а часом і рідинній хроматографії використовуються капілярні колонки, в яких НФ нанесена тонким шаром на стінки капіляра. Рівняння, що виражає величину H для капілярної колонки, не містить члена для вихрової дифузії (A), так як в такій колонці відсутній твердий зернистий адсорбент. В результаті

$$H = B/U + CU. \quad (3.18)$$

Позаколоночне розмивання. Джерела такого розмивання це вузол вводу хроматографічної проби, а також комунікації, що зв'язують вузол вводу та колонку, колонку та чутливий елемент детектора або сам детектор.

Таким чином, вплив усіх факторів, що викликають розмивання хроматографічної зони, можна врахувати за допомогою $D_{\text{еф}} = \sum D$ і тоді рівняння (13) прийме вигляд:

$$C = C_{\text{max}} e^{-\frac{X^2}{4D_{\text{еф}}t}}. \quad (3.19)$$

3.5. Елюційні характеристики

Існує два основних способи фіксації результатів хроматографічного аналізу: знаходження концентрації речовини в **нерухомій фазі** як функції від пройденого відрізка шляху ($C = f(S)$); або концентрації речовини в **рухомій фазі** як функції від часу, що вираховується з моменту вводу проби до моменту виходу її з колонки ($C = f(t)$). Графічне зображення цих функцій і є хроматограмою. Першу з них отримують, якщо потік РФ припиняють до моменту досягнення найбільш рухливим компонентом кінця шару адсорбенту. Має застосування в наш час виключно в хроматографії на площині.

Якщо в рухомій фазі, що виходить з колонки, безперервно вимірювати концентрацію речовини, яка хроматографується, а потім побудувати залежність цієї концентрації від часу елюції, то отримаємо картину, зображену на рис. 3.7 (O – момент вводу проби речовини; O' - момент появи з колонки максимуму концентрації речовини, що не сорбується і не утримується сорбентом, тобто це час, за який РФ в колонці повністю зміниться; AHB – хроматографічний пік (крива розподілу концентрації хроматографованої речовини в елюаті на виході з колонки); OO' або t_0 - час утримання компонента, що не сорбується; OG або t_R - час утримання компонента, що хроматографується.

Основна елюційна характеристика зразка – утримуваний об'єм:

$$V_R = \omega t_R, \quad (3.20)$$

де ω - об'ємна швидкість РФ, величина, що вимірюється експериментально або задається, як параметр хроматографічного приладу.

Утримуваний об'єм – це об'єм РФ і хроматографованої речовини, що міститься в ній, який пройшов через колонку з моменту вводу проби до мо-

менту появи на хроматограмі максимуму концентрації компонента, що аналізується.

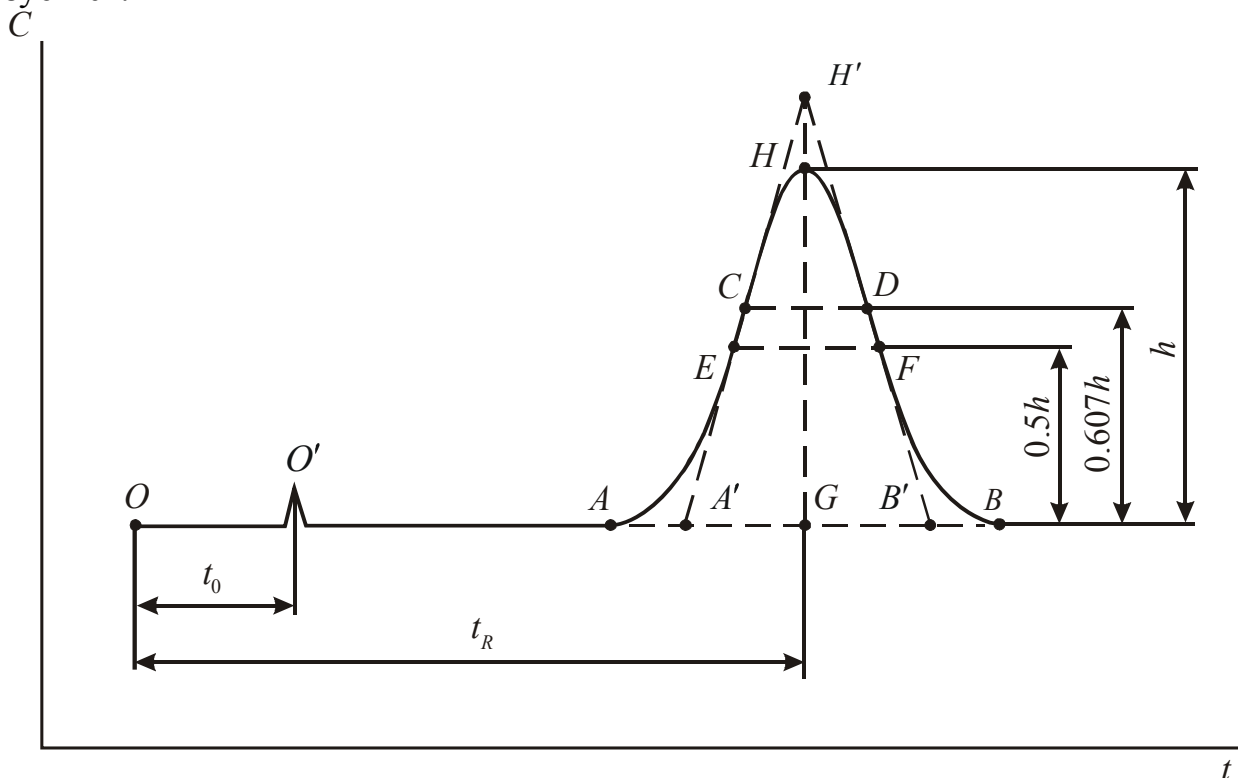


Рис. 3.7. Параметри хроматографічного піка.

Утримуваний об'єм включає в себе вільний або мертвий об'єм колонки

$$V_0 = \omega t_0, \quad (3.21)$$

і тому більш вірно користуватися виправленим утримуваним об'ємом

$$V_x = V_R - V_0 = \omega(t_R - t_0) = \omega t_x.$$

(3.22)

Фактор ємності є відношенням мас хроматографованої речовини в нерухомій і рухомій фазах:

$$k' = \frac{M_{\text{НФ}}}{M_{\text{РФ}}} = \frac{C_{\text{НФ}} \cdot V_{\text{НФ}}}{C_{\text{РФ}} \cdot V_{\text{РФ}}} = K \frac{V_{\text{НФ}}}{V_{\text{РФ}}}. \quad (3.23)$$

Фактор ємності є основною енергетичною характеристикою речовини на колонці і може бути визначений з експериментальних хроматографічних даних:

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{V_R}{V_0} - 1 = \frac{V_x}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{t_R}{t_0} - 1 = \frac{t_x}{t_0}. \quad (3.24)$$

Форма хроматографічного піка має вигляд залежності Гауса, так як визначається процесами, результат дії яких аналогічний дифузії. Величини перпендикуляра, опущеного з точки максимальної концентрації H на нульову лінію (тобто лінію, що відповідає виходу з колонки чистої РФ), називається висотою піка, дотичні, проведені в точках перегину кривої розподілу концентрації речовини (за Гаусом) відсікають на нульовій лінії відрізок $A'B' = 4\sigma$ -

справжню ширину піка; відрізок $CD = 2\sigma$ є Гаусовою напівшириною піка і з'єднує точки перегину кривої розподілу концентрації; відрізок EF є напівшириною піка (шириною піка на половині висоти).

3.6. Фактори, що впливають на хроматографічне розділення

Розглянемо хроматограму, що складається з двох піків, що відносяться до двох речовин суміші. Розділення бінарної суміші можливе лише в тому випадку, коли відношення часів їх утримування $\neq 1$, причому чим більша різниця в часах утримування, тим вищий ступінь їх розділення. Ступінь розділення характеризують критерієм розділення:

$$R = \frac{\Delta r}{4\sigma} = \frac{\Delta t_R}{4\sigma} = \frac{t_R'' - t_R'}{4\sigma}, \quad (3.25)$$

де Δr - відстань між максимумами двох хроматографічних зон в об'ємному або часовому вимірі; 4σ - ефективна або Гаусова ширина піка (рис. 3.7).

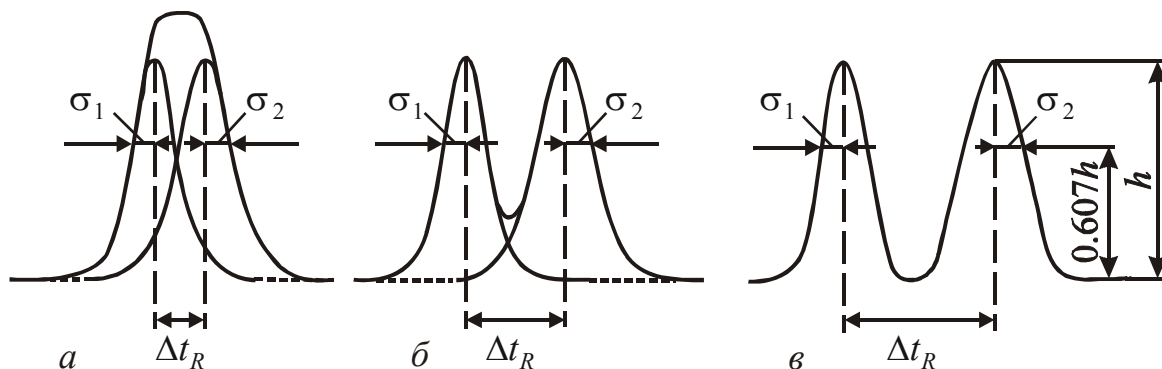


Рис. 3.8. Залежність ступеня розділення від різниці у часах утримування.

Однак величини Δt_R та σ залежать від багатьох факторів: природи сорбента, швидкості РФ, природи речовин, що розділяються і т.п., і в такому вигляді їх досить складно використовувати для оцінки можливості хроматографічної колонки щодо розділення.

Візьмемо рівняння $R = \Delta t/4\sigma$ і уявимо, що піки знаходяться дуже близько один до одного, так що $\sigma_2 = \sigma_1$. Тоді

$$R = \frac{\Delta t}{2(\sigma_2 + \sigma_1)}. \quad (3.26)$$

Задася значенням R . Нехай $R = 1$. Тоді

$$(t_2 - t_1) = 2(\sigma_2 + \sigma_1). \quad (3.27)$$

Поділимо ліву та праву частини рівняння (3.27) на t_1 , а перший член суми у правій частині помножимо та поділимо на t_2 :

$$\frac{t_2}{t_1} - 1 = 2 \left(\frac{\sigma_2 \cdot t_2}{t_2 \cdot t_1} + \frac{\sigma_1}{t_1} \right). \quad (3.28)$$

Ми отримали три нових змінних параметри, що не залежать від зовнішніх умов в широких межах: t_2/t_1 - відношення величин утримування; σ_1/t_1 та σ_2/t_2 - відносна дисперсія. Відносна дисперсія може служити мірою ефективності розділення на колонці по відношенню до одного з компонентів.

Відносне стандартне відхилення дорівнює квадрату відносної дисперсії:

$$RSV = \left(\frac{\sigma}{t} \right)^2. \quad (3.29)$$

Число теоретичних тарілок колонки

$$N = \frac{1}{RSV} = \left(\frac{t}{\sigma} \right)^2. \quad (3.30)$$

Різниця в часах утримування, що може бути досягнута на колонці по відношенню до пари компонентів:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t''_R - t_0}{t'_R - t_0} = \frac{t''_x}{t'_x} = \frac{V''_R - V_0}{V'_R - V_0} = \frac{V''_x}{V'_x},$$

(3.31)

характеризує селективність хроматографічної системи і завжди відноситься до розділення конкретних пар компонентів або сумішей.

Виходячи з того, що напівширина піка $\Delta_{1/2} = \sigma\sqrt{8\ln 2}$, можна виразити параметр σ через більш зручну для фізичного вимірювання напівширину піка:

$$\sigma = \frac{\Delta_{1/2}}{\sqrt{8\ln 2}}. \quad (3.32)$$

Тоді

$$N = 8\ln 2 \left(\frac{t_R}{\Delta_{1/2}} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{\Delta_{1/2}} \right)^2. \quad (3.33)$$

Остання формула може бути застосована для визначення ефективності будь-якої колонки по відношенню до конкретної речовини, причому час утримування та напівширина піка повинні мати однакові одиниці виміру: час, або довжина діаграми, на якій написана хроматограма. Знаючи N та довжину конкретної колонки, неважко знайти ВЕТТ за рівнянням (3.16) і побудувати експериментальний графік $H = f(\omega)$, який дає можливість підібрати оптимальну швидкість РФ для розділення тієї чи іншої конкретної суміші речовин. Необхідно також відзначити, що число теоретичних тарілок залежить від природи речовини і на одній і тій самій колонці може бути різним для різних речовин.

Для двох близько розташованих піків критерій розділення R може бути виражений через вклади індивідуальних характеристик колонки: фактор

розділення (селективність, α), ефективність (вузькість піка, N), фактор ємності (час перебування в колонці, k') останнього з двох компонентів. Рівняння, яке описує цю взаємозалежність, виглядає наступним чином:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k'_2}{k'_2 + 1} \right). \quad (3.34)$$

З останнього можна визначити число теоретичних тарілок колонки як функцію критерію розділення, селективності та ємності хроматографічної системи:

$$N = 16R^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \cdot \left(\frac{k'_2 + 1}{k'_2} \right). \quad (3.35)$$

4. МЕТОДИ ПРОВЕДЕННЯ ХРОМАТОГРАФІЇ

4.1. Колоночна рідинна хроматографія за низького тиску

Рідинна хроматографія може ґрунтуватися на явищі адсорбції або використовувати різницю коефіцієнтів розподілу компонентів суміші (відповідно рідинна адсорбційна або рідинна розподільна), а також іонний обмін і поділ за розміром молекул.

Адсорбційна колоночна хроматографія - перший приклад хроматографічного поділу - була відкрита російським ботаніком М.С.Цветом, який у 1903 р. повідомив, що йому вдалося розділити забарвлені речовини зеленого листа шляхом пропускання екстракту цього листа у петролейному ефірі через колонку, заповнену сахарозою і крейдою. Характеризуючи принцип свого відкриття, він писав: “При фільтрації змішаного розчину через стовп адсорбенту пігменти ... розшаровуються у вигляді окремих по-різному забарвлених зон. Подібно променям світла у спектрі, різні компоненти складного пігменту закономірно розподіляються один за одним у стовпі адсорбенту і стають досяжними для якісного визначення. Такий розфарбований препарат я назвав *хроматограмою*, а відповідний метод аналізу – *хроматографічним методом*”.

4.1.1. Загальні підходи до проведення колоночної рідинної хроматографії за низького тиску

Хроматографічний поділ сумішей рідинною колоночною хроматографією за низького тиску складається з наступних загальних стадій.

Підготовка колонки. Незалежно від типу нерухомої фази ефективність колонки визначається однорідним гранулометричним складом нерухомої фа-

зи, рівномірністю упаковування сорбенту в колонку і станом поверхні верхнього шару сорбенту. Заповнення колонки сорбентом можна проводити сухим (поступове додавання сухого сорбенту в заповнену рухомою фазою колонку) або мокрим способом (шляхом вливання в колонку суспензії сорбенту в рухомій фазі). При заповненні колонки необхідно якомога ретельніше видалити повітря з сорбенту. З цієї точки зору мокрий спосіб заповнення колонки більш зручний, оскільки більшу частину сорбованого повітря можна видалити під час приготування суспензії. Для рівномірного заповнення колонки адсорбентом, під час заповнення по ній постукують (приблизно в тому місці, де в цей момент осідає адсорбент) гумовим корком, закріпленим на паличці. Можна також періодично струшувати колонку за допомогою ручного вібратора або навіть застосувати тиск. Ні в якому разі не можна допускати висусування адсорбенту у колонці. Верхній шар сорбенту уберігають від скаламучування, прикриваючи його перфорованим фільтрувальним папером. Цей метод зручний головним чином для заповнення колонок дрібним силікагелем, хоча може застосовуватися для будь-якого адсорбенту. Після заповнення через колонку на протязі 2-3 годин пропускають рухому фазу для повного видалення повітряних бульбашок. Окрім того остання операція дає можливість привести адсорбент у стан рівноваги з рухомою фазою.

Нанесення проби і її хроматографування. Суміш речовин, що підлягає хроматографуванню слід висушити та зважити. З рідких сумішей ретельно видаляють розчинники у вакуумі. Існує три можливих способи приготування проби та введення її в колонку: 1) пробу розчиняють у рухомій фазі або в найбільш неполярному розчиннику з тих, що будуть застосовуватися у досліді, щоб отримати концентрований розчин, який потім піпеткою вводять у колонку. Ємність, у якій знаходилася проба, та піпетку споліскують невеликою кількістю рухомої фази чи розчинника, яку також вводять у колонку. Коли введений розчин всмокчеться, можна починати власне хроматографію; 2) якщо проба тільки частково розчинна, чи майже нерозчинна в неполярному розчиннику, то її розчиняють у мінімальній кількості полярного розчинника і отриманий розчин розводять неполярним розчинником. Якщо при цьому частина проби випадає в осад, то в колонку вводять рідкий шар, а операцію повторюють; 3) якщо проба має високу в'язкість або якщо це суміш сполук різної полярності, то її розчиняють у леткому полярному розчиннику (діетиловий етер, етилацетат, хлороформ) і отриманий розчин змішують з адсорбентом (приблизно половина кількості розчину за об'ємом) аналогічним адсорбенту в колонці. Розчинник випаровують у вакуумі за кімнатної температури, адсорбент що залишився має бути рухливим (сипучим). У разі необхідності розводять адсорбент з нанесеною пробєю свіжим адсорбентом і вводять його зверху в колонку тим же способом, яким проводилося її початкове заповнення.

Починати хроматографування слід найменш полярним розчинником (наприклад петролейним ефіром або гексаном). Зазвичай швидкість потоку

рухомої фази (мл/год) чисельно повинна дорівнювати масі (г) використаного адсорбенту. Хроматографування продовжують до появи з колонки чистого розчинника, Після цього елюційну силу суміші збільшують, підвищуючи вміст більш полярного компонента рухомої фази, котрий подають у декілька порцій до завершення процесу хроматографування.

Детектування хроматографічних смуг може проводитися, поки зони знаходяться в колонці і після їхнього виходу з колонки. При цьому забарвлені зони спостерігаються візуально, якщо речовини флуоресціюють, то їх можна спостерігати при опроміненні колонки ультрафіолетовим світлом, якщо не флуоресціюють - на тлі сорбенту, імпрегнованого люмінофором. Якщо детектування проводиться в елюаті, то або безперервно визначають параметр елюату, залежний від концентрації компоненту суміші (показник заломлення, кут обертання площини поляризації, оптичну щільність при визначеній довжині хвилі світла та ін.), або розбивають елюат на велике число невеликих фракцій, у кожній із яких наявність речовини, що хроматографується, визначається підходящим хімічним або фізико-хімічним методом. Фракції, що містять ту саму речовину, об'єднують. Процес розбивки елюату на фракції автоматизований за допомогою колекторів фракцій, здатних відбирати фракції елюату по масі, кількості крапель або за часом і направляти кожен фракцію в окремий приймач.

Кожний експеримент з хроматографічного розділення слід описати в лабораторному журналі; причому необхідно вказати всі умови експерименту, наприклад: масу проби, внутрішній діаметр і довжину колонки, тип адсорбенту, його масу, розмір часточок, активність, виробника тощо. Слід також вказати, які розчинники використовувалися, число фракцій, їх об'єми, масу залишків окремих чи об'єднаних фракцій, найважливіші особливості фракцій, наприклад їх забарвлення, здатність до часткової чи повної кристалізації тощо.

4.1.2. Особливості адсорбційної хроматографії

Апаратура. Правильний вибір розміру колонки для хроматографічного аналізу сумішей має велике значення для забезпечення чіткого розділення, а також впливає на швидкість аналізу. Надмірно довгі колонки можуть дуже затягти час досліду, навпаки, дуже короткі не зможуть забезпечити достатнє розділення суміші на складові компоненти. Велике значення має також співвідношення між довжиною та діаметром колонки.

Застосовують колонки циліндричної, конічної та телескопічної форми. Висота їх зазвичай, в залежності від поставленої мети, коливається від кількох сантиметрів до 10-20 м, діаметр – від кількох міліметрів до 8-20 см. У лабораторній практиці найчастіше застосовують колонки, виготовлені із скла, з відношенням їх довжини до діаметру в межах 40-100. В нижній частині колонки знаходиться пориста скляна платівка для утримування шару адсорбен-

ту, в найпростішому випадку замість неї вміщують грудку вати. Верхня частина іноді має розширення, яке слугує резервуаром для елюенту сферичної чи циліндричної форми для забезпечення більш рівномірної подачі рухомої фази. При хроматографуванні рідких сумішей колонку необхідно встановлювати строго вертикально, оскільки наявність навіть незначного нахилу суттєво збільшує *стінковий ефект*, тобто проникнення суміші, що аналізується вздовж стінки колонки без розділення.

Адсорбенти. Адсорбентами в рідинній адсорбційній хроматографії є тонкоподрібнені пористі матеріали з питомою поверхнею більше ніж $50 \text{ м}^2/\text{г}$.

Досить умовно адсорбенти поділяють на низько - та високоактивні. Високоактивні адсорбенти, тобто адсорбенти з досить високою концентрацією активних центрів (окис алюмінію, силікагель), переважно застосовуються для розділення хімічно інертних сполук, що адсорбуються порівняно слабо. Для розділення нестійких сполук або сполук, що сильно адсорбуються, застосовуються малоактивні або інертні адсорбенти (крохмаль, діатоміт).

Частіше всього в практиці адсорбційної хроматографії застосовують оксид алюмінію і силікагель. В спеціальних випадках можна застосовувати оксиди, гідроксиди і карбонати кальцію і магнію, активоване вугілля, целюлозний і поліамідний порошок.

При виборі підходящого адсорбенту необхідно визначити його "тип" (тобто його активність, природу активних центрів, рН поверхні), величину питомої поверхні та діаметр пор.

Різні типи адсорбентів проявляють неоднакову селективність по відношенню до сполук різних типів. Полярні адсорбенти (оксиди металів, силікат магнію і т.п.) селективно адсорбують ненасичені, ароматичні та полярні молекули, такі, як спирти, аміни та кислоти. Полярні адсорбенти можна далі поділяти на кислотні, основні та нейтральні у відповідності до рН поверхні. Силікагель та силікат магнію відносяться до кислотних адсорбентів, отже вони хемосорбують основи. Хоча хемосорбція є ефективним методом концентрування, кількісне хроматографічне розділення у даному випадку неможливе через труднощі десорбції. Основи краще за все розділяти на адсорбентах основного характеру, наприклад оксиді магнію. Аналогічно адсорбенти основного характеру хемосорбують кислоти, тому останні краще розділяти на кислотних адсорбентах. Неполярні адсорбенти, наприклад графітована сажа (активний адсорбент), та кізельгур чи діатоміт (малоактивний адсорбент), не проявляють селективності по відношенню до полярних молекул. Кізельгур відноситься до настільки слабких адсорбентів, що його використовують як твердий носій нерухомої рідкої фази в рідинній розподільчій хроматографії (див. стор. 31).

Величина питомої поверхні та діаметр пор адсорбенту залежать від способу його одержання. Вірогідно, немає двох виробників, які б випускали силікагелі з однаковою питомою поверхнею та діаметром пор. Слід навіть звертати увагу на ті випадки, коли одна і та ж фірма виробляє продукцію на

заводах, розміщених у різних місцях. Властивості адсорбентів, одержані на різних заводах, рідко бувають ідентичними. Тому необхідно звертати увагу на властивості адсорбенту, що використовується у конкретних аналітичних дослідах і завжди, коли це можливо, стандартизувати адсорбент за якою-небудь специфічною ознакою. Стандартність чи постійність властивостей є надзвичайно важливою вимогою до того чи іншого адсорбенту. Якщо не дотримуватися цієї вимоги, то при співставленні різних дослідів можуть виникнути суттєві труднощі через неоднаковість умов експерименту. Оскільки адсорбційні властивості адсорбенту залежать від способу його приготування, а також наступної його обробки та вмісту вологи, виникає необхідність не тільки приготування адсорбенту за єдиною стандартною методикою та з однакової сировини, але й встановлення єдиних методів характеристики й порівняння адсорбційної ємності адсорбентів.

Вибір певного *ступеня дисперсності* адсорбенту теж має важливе значення. Чим менші часточки адсорбенту, тим швидше встановлюється адсорбційна рівновага і тим краще працює колонка. З іншої сторони, збільшення ступеня дисперсності викликає зростання гідравлічного опору колонки. Одним із методів боротьби з цим небажаним явищем є застосування адсорбентів з однаковими за розміром часточками, тобто *ізодисперсних* адсорбентів. Ізодисперсні адсорбенти мають значно менший гідравлічний опір ніж полідисперсні, тому ізодисперсність слід визнати однією з суттєвих їхніх переваг.

Силікагель. Адсорбенти загальної формули $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ називають діоксидом кремнію, силікагелем чи кремнієвою кислотою. Силікагель у наш час є чи не найбільш поширеним в лабораторній практиці адсорбентом, оскільки він має високу *лінійну ємність* (максимально допустиму масу зразка на 1 г адсорбенту), інертний по відношенню до найбільш нестійких розчинених речовин та цілком доступний.

Силікагель одержують або осадженням кислотами з розчинів солей кремнієвої кислоти (наприклад силікату натрію), або гідролізом полігалогенідів кремнію (наприклад тетрахлориду кремнію) у рідкій чи паровій фазі. Розмір пор, питома поверхня та природа поверхні залежать від способу приготування адсорбенту. Наприклад, зміна рН розчину у період утворення гелю з силікату натрію дає можливість одержати силікагелі з питомою поверхнею від 200 (рН = 10) до 800 м²/г (рН ≤ 4). Крупнопористі силікагелі, що застосовуються переважно для хроматографії у тонкому шарі (див. стор. 40) мають питому поверхню 30-600 м²/г і пори діаметром 10-25 нм. Вони мають напівкристалічну структуру, відносно однорідну поверхню, вкриту переважно вільними гідроксильними групами (4-5 гідроксильних груп на 10 нм поверхні). Тонкопористі силікагелі з середнім діаметром пор < 10 нм і питомою поверхнею > 500 м²/г мають нерегулярну аморфну структуру, поверхня їх вкрита переважно реакційно здатними та зв'язаними гідроксильними групами. Застосовуються вони переважно в рідинній колоночній хроматографії

усіх видів. Поверхня висушеного на повітрі силікагелю містить фізично адсорбовану воду. В результаті нагрівання за температури 150-200°C на протязі 4-6 годин або 105-110°C на протязі 24-36 годин видаляється практично вся фізично адсорбована вода і поверхня силікагелю активується. Необхідно, однак мати на увазі, що активація силікагелю призводить до зменшення лінійної ємності адсорбенту у кілька, а часом і кільканадцять разів. Активація силікагелю за температури 200-400°C призводить до втрати води з поверхні за рахунок утворення силоксанових груп. Регідратація таких груп трудомістка і потребує тривалого нагрівання з водою за 95°C. Нагрівання силікагелю за температури вище 400°C викликає необоротну втрату води, в результаті чого адсорбент втрачає селективність. Для одержання силікагелю із заданою активністю, необхідно додати до сухого свіжо активованого адсорбенту відміряну кількість дистильованої води. Співвідношення між кількістю введеної води і одержаною активністю силікагелю наведено в табл. 4.1. У більшості випадків для хроматографії годиться адсорбент, що містить 10-12% води. Якщо вміст води перевищує 16%, то розділення відбувається за механізмом, характерним для розподільчої хроматографії.

Наявність поверхневих гідроксильних груп пояснює селективні адсорбційні властивості силікагелю, тобто силікагель адсорбує ненасичені, ароматичні та полярні органічні сполуки через утворення водневих зв'язків, причому розчинена речовина є донором електронів. На силікагелі кратні вуглець-вуглецеві зв'язки вносять дещо менший вклад в енергію адсорбції зразка, ніж на інших полярних адсорбентах, тому ароматичні вуглеводні, а також сполуки, що розрізняються лише за відносним ступенем ненасиченості, краще розділяються на інших полярних адсорбентах, наприклад оксиді алюмінію. Поверхня силікагелю має слабкі кислотні властивості, тому сполуки основного характеру ($pK_B < 5$) адсорбуються на ній краще, ніж на нейтральних чи основних адсорбентах.

Оксид алюмінію. Після силікагелю оксид алюмінію є найбільш поширеним адсорбентом. Як і силікагель, оксид алюмінію полярний адсорбент, і порядок виходу розчинених речовин на цих двох сорбентах взагалі однаковий. З практичної точки зору є три важливих відмінності оксиду алюмінію від силікагелю:

- енергія адсорбції молекул, що містять ізольовані та супряжені подвійні зв'язки, на оксиді алюмінію вища, тому діапазон величин адсорбційних коефіцієнтів таких сполук на ньому ширший і він більше придатний для розділення ароматичних сполук;

- оксид алюмінію містить на поверхні сильно основні центри і тому переважно адсорбує сполуки кислотного характеру. Сильні кислоти ($pK_a \leq 5$) хемосорбуються на оксиді алюмінію, а більш слабкі можна розділити у відповідності до їхніх значень pK_a , особлива використовуючи основні елюенти;

- активований оксид алюмінію має досить високу каталітичну активність і не повинен застосовуватися для деяких розділень тому, що ряд речо-

вин піддається хімічному перетворенню на реакційно здатних центрах. Наприклад, утворення солей з кислотами, гідроліз естерів та ангідридів кислот, реакції конденсації з альдегідами та кетонами, реакції елімінування галогеноводнів, ізомеризація та полімеризація олефінів тощо.

Оксид алюмінію має декілька кристалічних форм в залежності від способу одержання та термічної обробки. Оксид алюмінію для хроматографії в основному складається з γ -форми, у кристалічній ґратці якої кожен атом алюмінію оточений шістьма атомами кисню, а кожен атом кисню – трьома атомами алюмінію і атомом водню, що утворює внутрішньомолекулярний водневий зв'язок. В оксиді алюмінію є система правильних циліндричних мікропор діаметром 2,7 нм і безладно розміщені мікропори більшого діаметра. Оксид алюмінію для хроматографії розрізняють головним чином за ступенем гідратації поверхні. Більша частина води, що міститься в оксиді алюмінію, утворює поверхневі гідроксильні групи або знаходиться у адсорбованому стані. Після прожарювання за 300°C на протязі 4-6 годин більша частина води видаляється, одночасно решта молекул води реагує з поверхнею, в результаті чого утворюються ОН-групи. При подальшому нагріванні за температури вище 400°C гідроксильні групи поступово видаляються, однак не зникають зовсім навіть за нагрівання у вакуумі за 800-1000°C. Тим не менше, хроматографічна активність із збільшенням температури активації аж до 1100°C зростає. Цей факт вважається доказом того, що гідроксильні групи в адсорбції на оксиді алюмінію важливої ролі не грають, на відміну від силікагелю. Для оксиду алюмінію розрізняють три типи поверхневих адсорбційних центрів: 1) кислотні з позитивним зарядом; 2) основні, або протонаакцепторні, та 3) електронакцепторні, що утворюють комплекси з переносом заряду із сполуками, які легко поляризуються (наприклад ароматичні вуглеводні). Сполуки, що адсорбуються на кислотних центрах, найбільш численні. Розміри часточок товарних марок оксиду алюмінію лежать в межах 0,004-0,2 мм, питома поверхня – 70-200 м²/г, розмір пор – 6-15 нм, питома вага – близько 0,9 г/см³.

У практичній роботі застосовується лужний, нейтральний і кислий оксид алюмінію. Основна форма оксиду алюмінію (*лужний оксид алюмінію*) дає водну витяжку з рН 9,5-10,5 в залежності від умов одержання. Лужний оксид алюмінію застосовується для розділення ненасичених та ароматичних вуглеводнів, стероїдів, алкалоїдів, синтетичних барвників та інших сполук, стійких у лужному середовищі. Найбільша адсорбційна здатність спостерігається у оксиду алюмінію I ступеню активності, який одержують прожарюванням шару товарного зразка товщиною 3-5 см за температури 350°C на протязі 6-8 годин. Адсорбент нижчих ступенів активності (до V) можна приготувати з нього шляхом зволоження, додаючи 3-5% води від маси адсорбенту для зменшення активності на один ступінь (див. табл. 4.1). Активність оксиду алюмінію можна установити пробною хроматографією азобарвників, застосовуючи метод Брокмана і Шоддера.

Таблиця 4.1.

Залежність активності силікагелю, оксиду алюмінію та силікату магнію від кількості доданої води

Активність	Вміст води (%)		
	Силікагель	Оксид алюмінію	Силікат магнію
I	0	0	0
II	5	3	7
III	15	6	15
IV	25	10	25
V	38	15	35

Нейтральний оксид алюмінію застосовують найчастіше (рН його водної витяжки 6,9-7,1) На дезактивованому адсорбенті можна розділяти менш стійкі сполуки, наприклад альдегіди та кетони, хінони, глікозиди, а також сполуки, нестійкі у лужному середовищі, наприклад естери та лактони. Окрім того він годиться для розділення слабких органічних кислот. Готують нейтральний оксид алюмінію із лужного, ретельно промиваючи останній дистильованою водою до потрібного значення рН. Для прискорення процесу лужний оксид алюмінію доцільно промити розведеною соляною чи оцтовою кислотою, а вже потім відмивати дистильованою водою до нейтральної реакції. Активують чи дезактивують нейтральний оксид алюмінію аналогічно лужному.

Кислий оксид алюмінію зазвичай одержують промиванням лужного чи нейтрального оксиду алюмінію соляною чи оцтовою кислотами до рН водної витяжки близько 4. На кислому оксиді алюмінію хроматографують деякі природні та синтетичні барвники, амінокислоти, ароматичні та аліфатичні карбонові кислоти.

Силікати магнію. Ці адсорбенти є продуктами співосадження діоксиду кремнію та оксиду магнію. Найбільш відомим адсорбентом такого типу є флорісил, що містить близько 84 % діоксиду кремнію. Флорісил має середній діаметр пор 6,2 нм та питому поверхню 300 м²/г. Активований флорісил, одержаний нагріванням до 400°C на протязі 16 годин, має сильні кислотні властивості, тому окрім хемосорбції азотистих основ, адсорбує селективно та необоротно сполуки інших класів, наприклад естери та ароматичні вуглеводні. В результаті дезактивації одержують адсорбент, що за своїми властивостями займає проміжне положення між силікагелем та оксидом алюмінію. Його успішно застосовують для розділення деяких стероїдів, що практично не утримуються оксидом алюмінію, ліпідів, глікозидів та деяких похідних сахарів.

Вуглецеві адсорбенти. Для хроматографічного аналізу сумішей сполук, які належать до одного гомологічного ряду, найбільш підходящим адсо-

рбентом є активоване вугілля. Його одержують деструктивною перегонкою деревини чи кісток з наступною активацією. Активації досягають повільним окисненням за підвищених температур повітрям, паром, діоксидом вуглецю чи хлором чи просяканням солями, кислотами чи лугами з наступним прожарюванням. Одержане таким чином вугілля має гетерогенні поверхні, що містять, окрім органічних функціональних груп, неорганічні атоми, що значно ускладнює інтерпретацію даних про адсорбцію.

Іншим типом вуглецевих адсорбентів є сажа, що утворюється при неповному згоранні вуглеводнів. Зазвичай поверхня сажі гідрофобна, неполярна і проявляє погану специфічність по відношенню до функціональних груп. Однак через наявність неорганічних речовин та полярних функціональних груп типу карбонільних, карбоксильних чи фенольних, поверхня містить також гідрофільні центри. Саме тому сажі є досить цінними та селективними адсорбентами. Завдяки графітій структурі ароматичні вуглеводні на сажі адсорбуються сильніше, ніж відповідні аліфатичні похідні. Необхідно відмітити, що елюційна сила розчинника зростає із збільшенням розмірів молекул розчинника, причому ароматичні розчинники повинні бути сильніші за відповідні аліфатичні аналоги.

Модифіковані адсорбенти. Властивості силікагелю та інших полярних адсорбентів можуть бути модифікованими через введення в їх склад комплексоутворюючих чи інших реагентів. Наприклад, розділення ненасичених вуглеводнів значно поліпшується, якщо до силікагелю чи оксиду алюмінію додати 3-10% нітрату срібла. На обробленому кофеїном, тринітробензолом чи пікриновою кислотою оксиді алюмінію краще розділяються поліядерні ароматичні вуглеводні, а на обробленому бісульфітом натрію силікагелі - альдегіди та кетони тощо.

Елюенти. Характер рухомої фази впливає на селективність розділення, роздільну здатність колонки та середню швидкість руху хроматографічних зон компонентів суміші, що розділяється. На елюційну здатність рухомої фази впливають наступні три фактори: 1) взаємодія між молекулами рухомої фази (розчинника) та сполуки, що хроматографується (адсорбату); 2) взаємодія між адсорбованими молекулами адсорбату та молекулами рухомої фази; 3) взаємодія між адсорбованими молекулами рухомої фази та адсорбентом.

Для полярних адсорбентів розчинники неполярного характеру (наприклад, насичені вуглеводні чи їх галогенпохідні) як правило є слабкими елюентами, в той час як полярні розчинники (наприклад, спирти, кислоти, основи) мають сильну елюційну здатність. Мірою елюційної здатності розчинників слугує параметр ε^0 , що численно виражає енергію адсорбції розчинника, що припадає на одиницю площі поверхні адсорбенту стандартної активності. Визначаючи елюційну силу розчинника, порівнюють його ε^0 та пентану, для якого $\varepsilon^0 = 0$.

В табл. 5.1. вказані найбільш поширені у хроматографічній практиці

розчинники, розміщені у так званій *елюотропний ряд*, та наведені їх основні фізико-хімічні характеристики. Елюційна здатність розчинників різна для різних адсорбентів, тому нижче наведені коефіцієнти для розрахунку ε^0 стосовно основних видів адсорбентів:

$$\varepsilon_{\text{SiO}_2}^0 = 0,77 \varepsilon_{\text{Al}_2\text{O}_3}^0 ; \quad \varepsilon_{\text{Флорісил}}^0 = 0,52 \varepsilon_{\text{Al}_2\text{O}_3}^0 . \quad (4.1)$$

В неполярних адсорбентах визначальним фактором є неспецифічні вандерваальсові сили; в цих випадках елюційна здатність зростає приблизно симбатно молекулярній масі, а порядок зміни величини елюційної сили практично протилежний порядку їх зміни для полярних адсорбентів. Таким чином, для вугільних адсорбентів можна навести наступний скорочений елюотропний ряд (розчинники наведені у порядку зростання елюційної здатності): вода – метанол – етанол – ацетон – пропанол – диетиловий етер – бутанол – етилацетат – *n*-гексан – бензол.

Хроматографічний аналіз проводиться шляхом ступінчатої елюції з використанням підбраного по табл. 5.1 елюотропного ряду розчинників із зростаючою елюційною здатністю або підходящої суміші двох розчинників, зазвичай близьких за величинами ε^0 , якщо потрібно більш тонко впливати на селективність розподілу. Недоцільно користуватися сумішами з дуже малим вмістом сильно полярного компонента, тому що він буде переважно адсорбуватися і відбудеться розподіл суміші розчинників, яке призведе до утворення другого фронту елюційної системи. Окрім ступінчатої елюції можна застосовувати градієнтну елюцію: поступово збільшувати елюційну силу рухомої фази (детальніше див. стор. 96).

Підбір елюційної сили рухомої фази – відносно складне завдання, особливо при ступінчатому чи градієнтному хроматографуванні. З цією метою дуже зручні елюотропні ряди розчинників для адсорбційної колоночної хроматографії. Приклади таких елюотропних рядів для хроматографії на силікагелі та оксиді алюмінію наведені у табл. 5.2 та 5.3. Для покращення селективності хроматографічної системи завжди доцільно змінювати найбільш полярний компонент рухомої фази, зберігаючи при цьому елюційну здатність (ε^0) системи, тому потрібно мати принаймні декілька варіантів складу рухомої фази з однаковим значенням ε^0 . Очевидно, наприклад, що на силікагелі однакову елюційну здатність має 4% розчин діетилового етеру в пентані, 26% розчин метиленхлориду в пентані та 4% розчин етилацетату в пентані. Окрім того, не можна чекати, що заміна пентану, наприклад, на гексан чи гептан матиме суттєвий вплив на селективність хроматографічної системи.

Вимоги до якості розчинників. Розчинники повинні бути обов'язково очищені перегонкою. Це викликано тим, що елюювання проводиться великою кількістю розчинника і навіть невеликі кількості домішок забруднюють речовини, що розділяються. Відігнані з хроматографічних фракцій розчинники можуть бути використані повторно. Суміші розчинників, якщо їх важко розділити перегонкою, як правило, використовувати не можна. Розчинники,

що використовуються з хроматографічною метою, зазвичай безводні. Однак через те, що, як правило, використовуються дезактивовані адсорбенти, що готуються додаванням до них води, то доцільніше було б застосовувати рухомі фази, що вже містять деяку кількість води, достатню для того, щоб вона не витягувалася з адсорбенту, оскільки це призвело б до збільшення його активності. Частіше за все цю обставину не враховують, та при необхідності підтримувати стандартні умови розділення, то її обов'язково потрібно мати на увазі. Необхідно також відмітити, що простим додаванням води до сухого неполярного розчинника важко отримати насичений водою компонент рухомої фази з потрібним вмістом води. Краще за все це робити за допомогою спеціальної хроматографічної колонки, заповненої певною кількістю адсорбенту з контрольованою вологістю.

Ступінь адсорбції і будова органічних речовин. Адсорбційні явища і їхні закономірності по-різному виявляються на полярних і неполярних адсорбентах.

Ступінь адсорбції органічних речовин на полярних адсорбентах залежить від наявності функціональних груп, подвійних зв'язків, ароматичних і гетероциклічних кілець, конфігурації молекули, величини її дипольного моменту, здатності поляризуватися і мало залежить від розміру молекули. Наявність функціональної групи збільшує ступінь адсорбції речовини в порівнянні з вуглеводнем, причому функціональні групи за ступенем адсорбції на оксиді алюмінію можна розташувати в такій ряд (в порядку збільшення ступеню адсорбції): Cl, H, OCH₃, NO₂, N(CH₃)₂, COCH₃, COCOCH₃, NHCOCH₃, NH₂, OH, CONH₂, COOH. Збільшення числа функціональних груп підвищує ступінь адсорбції. Накопичення в молекулі числа подвійних зв'язків, особливо конденсованих ароматичних кілець, також приводить до збільшення ступеню адсорбції.

На неполярних (гідрофобних) адсорбентах адсорбція дуже сильно залежить від розміру молекули. Із збільшення молекулярної маси ступінь адсорбції зростає. Максимум адсорбційної здатності відповідає молекулярній масі біля 10000. Вище цього значення адсорбційна здатність зменшується внаслідок того, що великі молекули не можуть проникнути в пори адсорбенту.

Для вуглеводнів ступінь адсорбції зменшується в ряду: ароматичні вуглеводні - нормальні парафіни - циклопарафіни - ізо-парафіни. В гомологічних рядах здатність адсорбуватися зростає зі збільшенням молекулярної маси.

Наведені дані є тільки орієнтовними тому, що повністю передбачити перебіг хроматографічного процесу поки що неможливо, бо і характер розчинника і адсорбент також сильно впливають на порядок розподілу хроматографічних смуг. Умови хроматографування обирають емпіричним шляхом.

В сучасному варіанті колоночна хроматографія за низького тиску зображена на рис.4.1. Резервуар 1 із розчинником (або сумішшю розчинників) забезпечує сталість складу і температури елюенту. За допомогою насосу 2

здійснюється рівномірна подача рухомої фази. Високоєфективна колонка 3 забезпечує поділ суміші. Детектор 4 визначає наявність компонента суміші в елюаті і дає команду на переключення колектора. Датчик 5 колектора фракцій 6 розбиває елюат на фракції. Мікропроцесор 7 задає швидкість додавання розчинника і відключає його у визначений момент часу або при заповненні всіх ємностей колектора; за сигналами детектора фіксує утримувані об'єми компонентів суміші і номери ємностей колектора, що містять фракції з даною речовиною; управляє роботою колектора фракцій, самописця і друкарського пристрою.

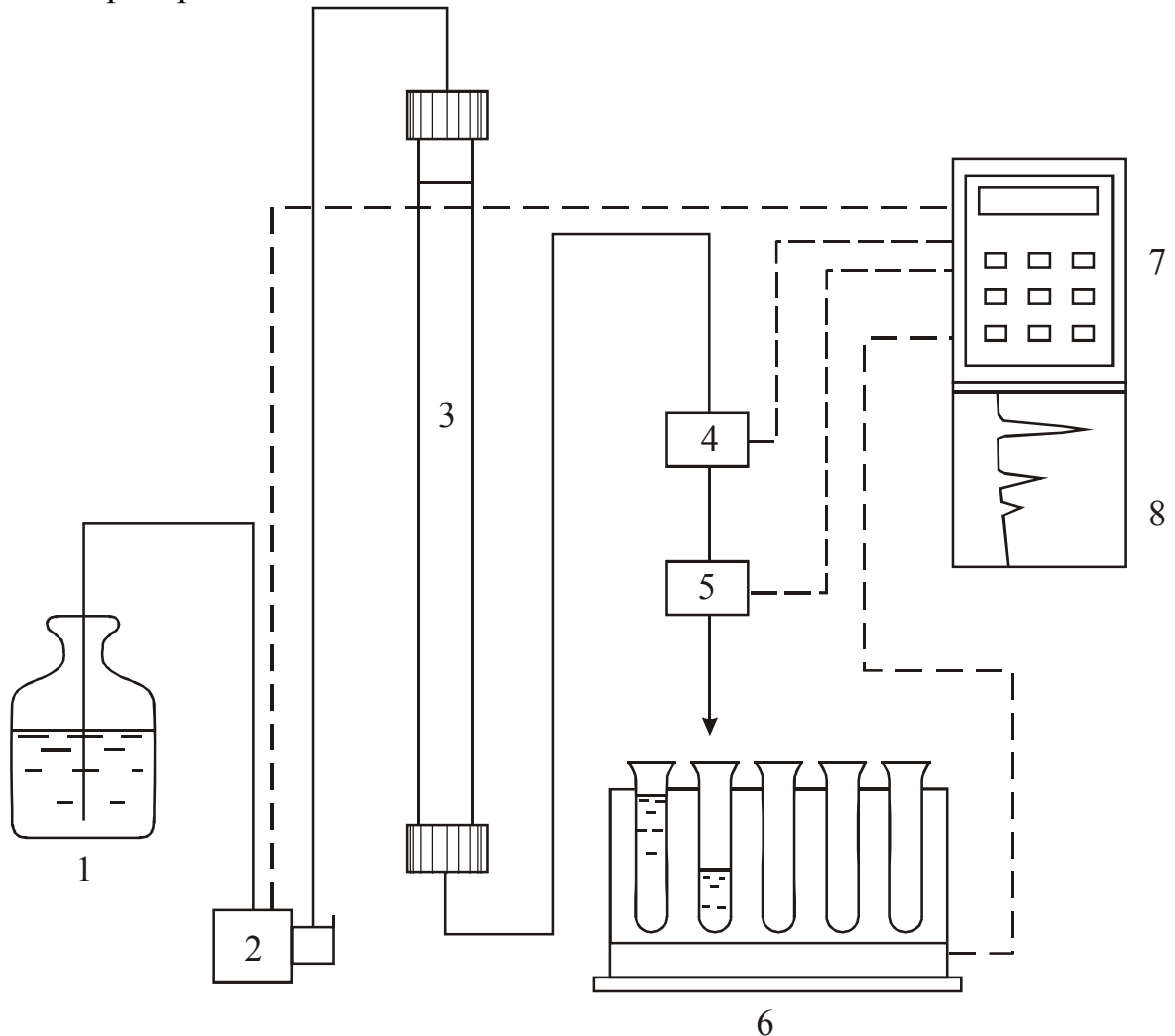


Рис. 4.1. Колоночна хроматографія за низького тиску.

4.1.3. Особливості розподільчої хроматографії

Поділ суміші речовин методом розподільчої хроматографії відбувається за рахунок різниці коефіцієнтів розподілу компонентів суміші між двома рідинами, що не змішуються, із яких одна є нерухомою фазою, а інша - рухомою (елюентом). Розподіл компонента суміші між двома такими фазами можна виразити наступною формулою:

$$K_p = \frac{C_{\text{НФ}}}{C_{\text{РФ}}}, \quad (4.2)$$

де K_p – коефіцієнт розподілу компонента між нерухомим та рухомим розчинниками; $C_{\text{НФ}}$ – молярна концентрація компонента суміші у нерухомій фазі; $C_{\text{РФ}}$ – молярна концентрація компонента суміші у рухомій фазі. Коефіцієнт розподілу залежить від природи речовин, що розділяються, природи розчинників і температури. Незавжди помітити, що рівняння (4.2) аналогічне рівнянню (3.9) (див. стор. 8). Ідеальна теорія розподільчої хроматографії також припускає: 1) розподіл речовини між фазами проходить практично миттєво; 2) дифузія речовини вздовж колонки відсутня; 3) час формування фронту рухомого розчинника близький до нуля.

В ідеальній розподільчій системі нерухома рідка фаза знаходиться у рівновазі з рухомою фазою, а кількість і розподіл нерухомої рідини в системі залишаються на постійному рівні. “Неідеальність” системи може бути викликана різними факторами, наприклад взаємною розчинністю двох контактуючих фаз або зміною розчинності через несталість температури тощо. Саме тому у розподільчій хроматографії застосовують пари фаз, що попередньо приведені у стан рівноваги, тобто рухома фаза насичена нерухомою фазою за робочої температури колонки. В разі ретельного виконання цієї операції нерухома фаза, що знаходиться у колонці, не буде розчинятися у рухомій. В результаті перенос нерухомої фази буде відсутній і залишиться лише рівноважний обмін молекулами. Для насичення рухомої фази її струшують на протязі 24 годин з надлишком нерухомої фази за температури колонки. Перед використанням насичену рухома фаза залишають стояти кілька годин, щоб дати осісти суспендованим краплинам нерухомої фази. Окрім того, в хроматографічній системі між резервуаром з рухомою фазою та колонкою, на якій буде відбуватися хроматографування, поміщають так звану попередню колонку; причому обидві колонки мають знаходитися у одному термостаті. Така колонка має виправити будь-які порівняно невеликі недо- та перенасичення рухомої фази.

В рідинній розподільчій хроматографії рухомі фази – це індивідуальні розчинники або їх суміші, що мають порівняно невелику молекулярну масу. Пояснюється це тим, що рухомі фази повинні мати низьку в’язкість, для того, щоб тиск, необхідний для протискування розчину через шар нерухомої фази, був мінімальним. Для певного ступеня розділення тривалість аналізу та в’язкість елюенту зростають паралельно. Тобто, якщо в’язкість елюенту збільшити у два рази, то тривалість розділення також подвоїться.

Встановлено, що швидкість дифузії в нерухомій фазі набагато менша, ніж у рухомій фазі, оскільки рідкі нерухомі фази зазвичай порівняно в’язкі і мають значну молекулярну масу, тому впливом дифузії при виборі нерухомої фази можна знехтувати. Використання ж більш в’язких рухомих фаз сприяє зменшенню ВЕТТ. В той же час для зменшення тривалості аналізу рекомен-

дується обирати рухомі фази з низькою в'язкістю. Оскільки абсолютна величина впливу в'язкості на висоту тарілки незначна, то майже завжди використовують рухомі фази з низькою в'язкістю. Теоретично пропонується використання рухомих фаз, що мають в'язкість за робочої температури не більше 0,4 сПз. На практиці ці межі розширені до 1 сПз (див. табл. 5.1).

В розподільчій хроматографії нерухома рідка фаза утримується інертними матеріалами (носіями), що мають велику питому поверхню та невеликий розмір часточок (50-200 мкм). Такими інертними носіями слугують діатоміт, силікагель, целюлоза, крохмаль (гідрофільні носії), силанізовані діатоміт і силікагель, ацетилцелюлоза та силіконовий полімер (гідрофобні носії). Основна властивість інертного носія, необхідна для успішного його застосування - повна інертність стосовно обох фаз та суміші, що розділяється, відсутність адсорбційної взаємодії, яка, однак, цілком ніколи не досягається.

У наш час виготовляються носії для розподільчої рідинної хроматографії з контрольованою поверхневою пористістю, так звані КПП-носії. Такі носії мають тверду сферичну кремнеземну серцевину та пористий поверхневий шар (рис. 4.2), що має контрольовану товщину і розмір пор. Відношення діаметру часточки (d) до товщини пористого поверхнього шару (t) у КПП-носіїв приблизно рівне 30.

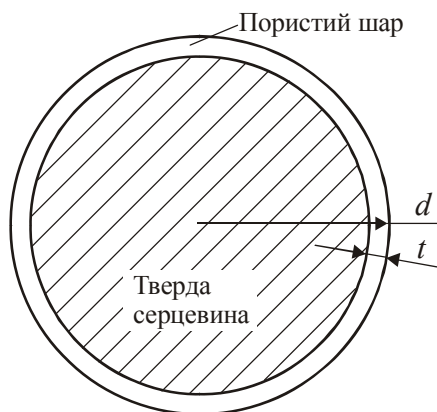


Рис. 4.2. Часточка з контрольованою поверхневою пористістю.

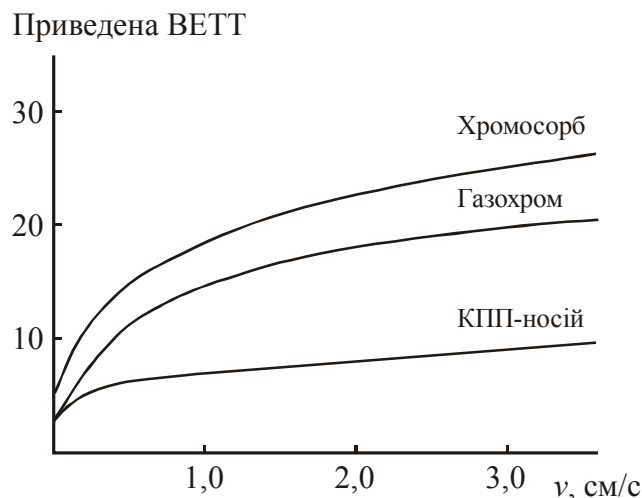


Рис. 4.3. Вплив носія на характеристику колонки.

Колонки з КПП-носіями мають значно кращі характеристики розділення особливо при швидкісних аналізах. На рис. 4.3 зображена залежність приведеної висоти тарілки від лінійної швидкості рухомої фази для різних носіїв. Приведена висота тарілки дорівнює відношенню дійсної висоти тарілки до середнього діаметра часточки. Це зручний спосіб приведення даних з висот тарілок до загального стандарту. Необхідно відмітити, що в той час як характеристики колонок із звичайними повністю пористими діатомітовими носіями (хромосорб та газохром) різко погіршуються із збільшенням швидкості

рухомої фази, збільшення висоти тарілки, що спостерігається у випадку КПП-носія значно менше.

Зазвичай нерухомою фазою є полярна рідина, закріплена на гідрофільному носієві. Така хроматографія отримала назву нормально-фазової розподільчої хроматографії або хроматографії з нормальними фазами. Розподільча хроматографія з рухомою гідрофільною і нерухомою гідрофобною фазою отримала назву оберненої-фазової розподільчої хроматографії або хроматографії з оберненими фазами. Метод нанесення нерухомої фази на носій досить простий. Певна кількість нерухомої рідкої фази розчиняється у підходящому відносно леткому розчиннику, розчин додається до відповідної кількості носія, змоченого тим самим розчинником. Розчинник досить повільно випаровується при постійному перемішуванні (краще за все на роторному вакуумному випаровувачі) для того, щоб нерухома фаза рівномірно розподілилася по поверхні носія. Сліди розчинника видаляють нагріванням у вакуумі. Одержаний у результаті такої обробки носій повинен бути сипучим.

Кількість нерухомої фази, що може бути нанесена на носій коливається в межах 1-40 г на 100 г носія в залежності від типу та будови останнього.

Апаратурне оформлення розподільчої хроматографії аналогічне адсорбційній, необхідно лише брати до уваги, що місткість системи твердий носій - нерухома фаза значно менше, ніж традиційних адсорбентів, тому масове співвідношення зразка і носія з нерухомою фазою складає від 1:500 до 1:5000.

Розподільча хроматографія з нормальними фазами найчастіше застосовується для поділу розчинних у воді речовин (цукрів, амінокислот, органічних барвників, алкалоїдів, карбонових кислот тощо). Хроматографією із оберненими фазами можна ділити стерини, вищі жирні кислоти, ароматичні сполуки.

Методом розподільчої хроматографії можна розділяти дуже малі кількості речовин, що фактично обмежуються можливістю детектування.

4.1.4. Ситова (ексклюзивна) хроматографія

Нерухомою фазою є адсорбент із визначеним розміром пор. Адсорбція відбувається головним чином всередині пор, тому речовини, розмір молекул яких менше діаметра пор, сорбуються значно краще, ніж речовини з розміром молекул, що перевищують діаметр пор. Адсорбенти в цьому випадку називають молекулярними ситами.

В залежності від розчинника, який виконує функцію рухомої фази ситову хроматографію поділяють на гель-фільтраційну і гель-проникну.

Гель-фільтраційна хроматографія застосовується для розділення молекул у відповідності з їх розміром у **водній** рухомій фазі. Найчастіше застосовується для розділення протеїнів та пептидів.

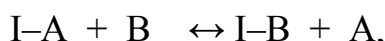
Гель-проникна хроматографія застосовується для розділення молекул у відповідності з їх розміром в **неводній** рухомій фазі (тобто рухомою фазою слугують органічні розчинники або їх суміші). Найчастіше застосовується для охарактеризування полімерів та визначення їх розподілу за молекулярними масами.

Слід зазначити, що механізм взаємодії речовини з нерухомою фазою може відрізнятися від адсорбції. Як молекулярні сита часто застосовують природні або синтетичні алюмосилікати, які кристалізуються з визначеною кількістю кристалізаційної води. При нагріванні вони втрачають воду й утворюють матеріал, дуже багатий порами - цеоліт. Якість природних цеолітів в значній мірі залежить від родовища, тому переважно користуються синтетичними. Діаметр пор цеолітів коливається від 0,38 до 0,13 нм. Особливо сильно вони поглинають воду, тому застосовуються в першу чергу для осушення газів і рідин. У відсутності води цеоліти можуть застосовуватися для відділення ненасичених парафінів від насичених, розгалужених вуглеводнів від вуглеводнів нормальної будови. Іншим типом молекулярних сит є сефадекси. Сефадекс - це декстран, переведений шляхом зшивання в нерозчинний стан. В воді сефадекс набрякає, поглинаючи при цьому кількість води, що перевищує масу сухої речовини в 3-10 разів (в залежності від марки).

Сефадекси та інші нерухомі фази, що набрякають, (наприклад, частково зшитий полістирол) придатні для роботи тільки при низькому тиску, тобто при малих швидкостях рухомої фази. При високому тиску застосовують пористе скло або силікагелі (ліхросорб, сферосил і ін.) із діаметром пор від 6 до 250 нм. Відомий ліхросорб із діаметром пор до 2500 нм. Часто поверхню носія хімічно модифікують, наприклад, силанізують для придання їй гідрофобних властивостей. Методом ситової хроматографії проводять як грубий поділ, наприклад, відділення білків і нуклеїнових кислот від неорганічних солей, так і точне фракціонування окремих амінокислот.

4.1.5. Іонообмінна хроматографія

Іонообмінники – це нерозчинні сполуки, здатні набрякати у водних розчинах, тобто поглинати воду у значних кількостях (0,5-5-кратна кількість від маси сухого іонообмінника) та вивільнювати іони в процесі електролітичної дисоціації. Вивільнені іони можуть заміщуватися на інші іони, що присутні у розчині, якщо у останніх більша спорідненість до іонообмінника. Цей процес, що називається **процесом іонного обміну**, можна описати рівнянням (I – іонообмінник):

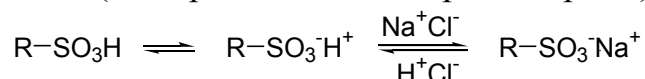


де А і В – іони з зарядами одного знаку. Процес іонного обміну оборотний, причому його направлення визначається в основному концентраціями іонів, а не їх спорідненістю до іонообмінника.

У відповідності до природи сполук іонообмінники ділять на дві групи: неорганічні, наприклад різноманітні мінерали, та органічні, наприклад смоли; причому ті і інші можуть бути як природними, так і синтетичними.

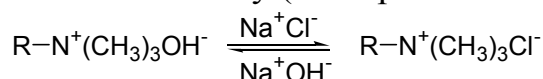
Іоногенні групи (тобто групи, що обмінюються) визначають функціональні властивості іонообмінника, тому їх називають також **функціональними групами**. Функціональні групи, типові для органічних іонообмінників, наведені у табл. 5.4.

Якщо іонообмінник вивільнює та обмінює катіони, то його називають **катіонообмінником** або **катіонітом**: такі іонообмінники являють собою полімерні багатоосновні кислоти. Розглянемо для прикладу сильноокислий сульфокислотний катіоніт (R – органічна полімерна матриця):



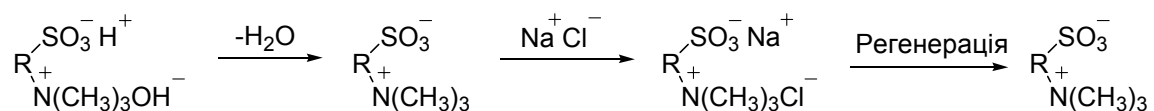
Іони водню та натрію, зв'язані з функціональними групами та здатні взаємно обмінюватися, називають **протиіонами**, супутні їм протилежно заряджені іони (в даному випадку іони Cl⁻) називають **коіонами**.

Аніонообмінники, або **аніоніти**, вивільнюють та обмінюють аніони; аніоніти являють собою практично нерозчинні багатоатомні основи. Наведемо приклад сильно основного аніоніту (четвертинна основа):



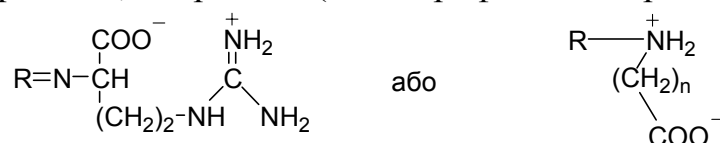
В цьому випадку протиіонами є іони OH⁻ чи Cl⁻, а коіонами – іони Na⁺.

Амфотерні іоніти містять у своїй матриці і катіонні, і аніонні іоногенні групи. Ці іоніти здатні утворювати внутрішні солі, які дисоціюють в контакт з електролітами та зв'язують обидва їхніх компоненти. Однак, ці іоніти легко регенерувати, промиваючи водою. Схема відповідної реакції наведена нижче.



Амфотерні іоніти легко привести до рівноважного стану, промиваючи буферним розчином. Іоніти цього типу не слід плутати з сумішами частинок катіонітів та аніонітів, що містяться в матеріалах, які застосовуються для демінералізації води в так званих процесах із змішаним шаром.

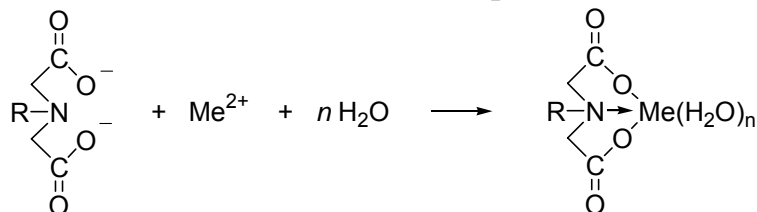
Біполярні іоніти – особливий тип амфотерних іонітів. З матрицею такого іоніту (полідекстран, агароза) зв'язані амінокислоти, які утворюють диполі у водному розчині, наприклад (R – гідрофільна матриця):



Такі іоніти дуже зручні для хроматографування біополімерів, з якими

ці диполі реагують селективно.

Хелатуєтворюючі іоніти містять функціональні групи, здатні утворювати комплексні зв'язки з іонами металів, наприклад Me^{2+} :



Вони переважно зв'язують важкі та лужноземельні метали. **Селективні іоніти** мають обмежену зв'язуючу здатність та зв'язують лише деякі іони. Синтезовані також **іоніти специфічної дії**, котрі містять спеціальні функціональні групи і селективно реагують з іонами лише одного типу.

Більшість іонітів – тверді речовини. До цієї групи іонітів відносяться тверді або набрякаючі мінерали та органічні іоніти, що після набрякання утворюють м'які гелі. Тверді іоніти застосовують у хроматографії в основному у формі часточок (зерен), які отримують або дробленням, або дисперсною полімеризацією; в останньому випадку часточки мають форму кульок. Виготовляють іоніти і у формі мембран, з них також можна одержувати трубки, капіляри, волокна, тканини тощо.

Структура іонітів. Серед неорганічних іонітів історично першими були алюмосилікати. Структурна комірка алюмосилікатів – тетраедр MO_4 , де $\text{M} - \text{Si}$ або Al . Якщо це алюміній, то у кристалічній ґратці один негативний заряд залишається ненасиченим, в результаті чого і стає можливим зв'язування катіонів. Тетраедричні комірки утворюють волокнисті, пластинчасті або тривимірні кристалічні структури з порами приблизно однакового розміру (0,22-1,2 нм), доступними для води та катіонів. Як іоніти алюмосилікати мають серйозні недоліки. Через невеликий розмір пор доступ до функціональних груп обмежений навіть для невеликих за розміром гідратованих катіонів, тому швидкість дифузії у таких катіонітах на чотири порядки менша, ніж у воді. Низька хімічна стійкість ґратки призводить до того, що такі іоніти можна використовувати лише у нейтральному середовищі.

Серед аморфних сполук можна відмітити гідроксиди Al , Fe , Mn , Th , Si , Sn та Zr . Іоніти цього типу мають невизначений стехіометричний склад, амфотерні та витримують нагрівання до 800°C . Вони не дуже селективні, їх хімічна стійкість та міцність залежать від рН середовища. Досліджені також іонообмінні властивості ряду інших нерозчинних сполук: фосфатів, арсенатів, силікатів, оксалатів, сульфідів, хроматів, вольфраматів декількох полівалентних металів (Sn , Zr , Bi , Th , Al , Ti), солей гетерополікислот та ферроціанідів двовалентних металів. Усі ці іоніти знайшли хоча й обмежене, та часто важливе застосування.

Структура органічних полімерів надзвичайно різноманітна, і в принципі можна синтезувати іоніти з самими різноманітними функціональними гру-

пами, різною пористістю та стабільністю.

Перші іонообмінні смоли одержували поліконденсацією фенолів з ароматичними амінами та формальдегідом. Пізніше конденсацією формальдегіду з сульфо-, карбокси-, сульфометил- чи амінометилфенолами та ароматичними амінами, модифікованими диціанамідом, чи аліфатичними амінами вдалося одержати іоніти інших типів. У наш час виробляють в основному полімерні іоніти на основі зшитого полістиролу та поліакрилових похідних. Їх легше синтезувати у відповідності з вимогами, тобто потрібної форми, потрібного хімічного складу та потрібної пористості. Окрім того, у своїй більшості вони мають світліше забарвлення та характеризуються більшою хімічною стійкістю, ніж продукти поліконденсації.

Відносно недавно в хроматографії почали використовувати іонообмінні полімери типу оксиалкілметакрилатного гелю з макропористою гідрофільною матрицею. Ці іоніти (карбоксиметильні, фосфо-, сульфо- та диетиламіноетильні похідні) хімічно стійкі, в їх пори можуть проникати без денатурації макромолекулярні біополімери.

В хроматографії біохімічних сумішей важливу роль відіграють похідні целюлози, що містять здатні до іонного обміну функціональні групи. На відміну від іонітів інших типів целюлозні іоніти виготовляють у формі волокон або мікрогранул. Останнім часом одержують і кульки хроматографічної целюлози, що застосовується як іонообмінник. Целюлози цього типу мають характерну структуру з великими порами, що проникні навіть для біополімерів з молекулярною масою до 10^6 , і проявляють сильну гідрофільність, тому вони більше підходять для аналізу біополімерних систем, ніж іонообмінні смоли з вуглеводневим скелетом.

Полідекстранові іоніти виготовляють на основі сефадексів, модифікуючи їх структуру карбоксиметильними, диетиламіноетильними, сульфоеетильними, сульфопропільними та четвертинними основними групами.

Декстранові іоніти відрізняються від целюлозних головним чином своєю фізичною структурою. Вони схожі на макропористі іонообмінні смоли, проявляють властивості пористих матеріалів після набрякання і їх так само, як і смоли, виготовляють у вигляді кульок. Однак пори декстранових гелів більші за діаметром, і в них можуть проникати макромолекули. Подібно целюлозним іонітам, ці матеріали характеризуються високою гідрофільністю, що дуже важливо при роботі з біополімерами.

Вибір іоніту для того чи іншого хроматографічного аналізу практично цілком залежить від хімічної природи сполук, що будуть хроматографуватися на іонообміннику. Для розділення неорганічних сполук підходять іонообмінні смоли або неорганічні іоніти. Для хроматографування низькомолекулярних іоногенних органічних сполук (амінів та інших основ, кислот, амінокислот, пептидів, нуклеозидів та нуклеотидів) слід користуватися іонообмінними смолами. Однак вони не підходять для аналізу білків. Біополімери (білки, нуклеїнові кислоти та їх високомолекулярні фрагменти) можна успішно роз-

діляти на іонообмінних похідних целюлози, полідекстрану та агарози. Сполуки основного характеру (а також амфотерні іони у слабкокислому середовищі) хроматографують у вигляді катіонів на катіонітах, а сполуки кислотного характеру (а також амфотерні іони у слабоосновному середовищі) – у вигляді аніонів на аніонітах. Для хроматографічного розділення катіонів чи аніонів переважно користуються сильними іонами. Слабкі іони частіше за все застосовують у спеціальних випадках, наприклад селективне видалення основ чи кислот з розчину без одночасного розкладу присутніх у ньому солей тощо. Амфотерні біополімери чи їх фрагменти можна хроматографувати на сильно- і слабкокислотних катіонітах, а також на сильно- і слабоосновних аніонітах.

Для хроматографії на іонообмінних смолах віддають перевагу монофункціональним (гомоіонним) іонам. Зазвичай це смоли типу стирол - дивінілбензол. Наявність у смолі функціональних груп лише одного типу дозволяє розраховувати на більш чітке розділення. Параметри хроматографічного процесу повинні бути такими, щоб при рухові рухомої фази в колонці існувала рівновага між рухомою та нерухомою фазами. Вирішальну роль при цьому відіграє розмір часточок іоніту. Чим дрібніші часточки, тим швидше встановлюється рівновага, тобто тим більшою може бути швидкість потоку рухомої фази. В той же час із зменшенням розміру часточок росте гідродинамічний опір колонки. Якщо часточки іоніту досить міцні (неорганічні іоніти, іонообмінні смоли), то хроматографування можна вести за підвищеного тиску. Деякі більш м'які іоніти (полідекстри) не витримують підвищеного тиску. В будь-якому випадку необхідно виявити оптимальний варіант. В хроматографії дуже важливо застосовувати якомога більш однорідні за розміром часточки, тому продажні іоніти додатково фракціонують за розміром.

Важливий фактор, що часто визначає вибір іоніту, – це **ступінь зшивки**. Він повинен бути достатньо великим, але при цьому молекули аналітів повинні проникати в іоніт. Якщо пори дуже малі, аналіти не можуть проникати до внутрішніх функціональних груп, а якщо пори дуже великі, погіршується ефективність розділення. Високий ступінь зшивки (наприклад X8 і вище) допустимий для розділення невеликих за розмірами неорганічних та органічних іонів (наприклад, амінокислот). Іоніти типу X4 застосовують для розділення низькомолекулярних пептидів та інших іонів середнього розміру, іоніти типу X2 – для розділення поліпептидів та іонів великих розмірів, але не макромолекул (останні розділяють на іонітах з макропористою матрицею).

Вибір колонки. При використанні органічного іонообмінника розміри колонки вибирають, керуючись наступними правилами: для нехроматографічного застосування відношення діаметра колонки до її довжини вибирають у межах 1:5–1:10, для більшості простих хроматографічних розділень – від 1:20 (частіше за все) до 1:50, а для деяких спеціальних розділень – до 1:200 і навіть більше. Для полідекстранових іонітів оптимальна висота колонки складає 20 см незалежно від діаметра колонки; для похідних целюлози застосо-

вують колонки висотою 5–15 см.

Визначаючи розміри колонки для певного хроматографічного експерименту, необхідно враховувати її ємність. Повну масу шару іоніта в грамах множать на величину ємності в мекв/г (величина, що наводиться в специфікації іоніту) і одержують повну ємність колонки. Ця ємність повністю використовується лише в чисто іонообмінних процесах. З хроматографічною метою використовують лише частину цієї ємності. У звичайній колоночній хроматографії зазвичай $\frac{1}{4}$, максимально $\frac{1}{2}$ повної ємності, у площинній хроматографії – 5-10%, а в високоефективній аналітичній хроматографії – близько 1% повної ємності. В хроматографії білків на іонообмінних похідних целюлози та декстрану ємність використовується на 10-20%.

Рухомі фази. Для простої елюції (ізократної) використовують єдиний елюент, причому зазвичай той, у якому розчинена хроматографована проба. Цей метод застосовується в аналітичній хроматографії, оскільки не потребує регенерації колонки. В окремих випадках цей метод застосовують і як препаративний.

Ступінчасту елюцію ведуть елюентами більш сильними, ніж той, у якому розчинена проба. Якщо колонка заповнена катіонітом у H^+ -формі, концентрація H^+ -іонів у рухомій фазі повинна бути вищою, а для хроматографії на аніоніті у сольовій формі необхідна більш висока концентрація інших протиіонів в елюційних буферних розчинах. Для розділення на аніоніті в OH^- -формі використовують елюенти зі зростаючою концентрацією OH^- -іонів, для розділення на аніоніті у сольовій формі – елюенти зі зростаючою концентрацією інших протиіонів. Іонну силу можна підвищити, додаючи в елюент нейтральні електроліти, частіше за все хлориди натрію та калію, при незмінній концентрації буферного розчину. Можлива також градієнтна елюція.

Іонообмінна хроматографія з успіхом застосовується для поділу алкалоїдів, амінокислот, білків, цукрів, фенолів, стероїдів, органічних кислот і вітамінів.

4.2. Хроматографія на площині

Розрізняють хроматографію в тонкому шарі (ХТШ) і паперову хроматографію. Хроматографія в тонкому шарі - це вид хроматографії з використанням сорбенту або нерухомої фази, рівномірно розподіленої на плоскій твердій пластині.

Метод тонкошарової хроматографії вперше був відкритий радянськими вченими Ізмайловим і Шрайбер у 1938 р., однак тільки приблизно з 1958 р. метод завоював широку популярність, в основному завдяки зусиллям німецького вченого Шталя, що удосконалив методіку і провів стандартизацію методу. Основною причиною відносно швидкого поширення ХТШ є те, що

метод дозволяє швидко здійснити досить ефективне розділення (300-3000 теоретичних тарілок в залежності від характеру та методу розділення), використовуючи прості та недорогі пристосування. Інша перевага ХТШ – широка область застосування – від якісного та напівкількісного аналізу до препаративного розділення. Окрім того, за допомогою ХТШ можна контролювати результати розділення, виконаного іншими методами, наприклад перегонкою чи колоночною хроматографією, перекристалізацією тощо.

Оскільки нерухома фаза в ХТШ складається з тонкого шару сорбенту, нанесеного на тверду інертну основу, пробу наносять на поверхню цього шару у вигляді плями чи смуги на деякій відстані від нижнього краю пластинки. Розділення проводиться в закритій камері за занурення частини шару сорбенту, що знаходиться нижче нанесеної проби, у рухому фазу, що рухається через нерухома фазу за рахунок капілярних сил чи примусово. Межу підйому рухомої фази, чи лінію фронту відмічають, пластинку сушать і проявляють (тобто одним з підходящих способів виявляють компоненти проби, що хроматографували). Речовини, що проявляються у вигляді забарвлених плям між лінією старту та лінією фронту рухомої фази, відмічають. Для цього вимірюють відстань від стартової лінії до центру плями (відрізок AB на рис. 4.4) та відстань від стартової лінії до лінії фронту (відрізок AC). Основним параметром, що використовується для визначення положення плями на ХТШ-хроматограмі є коефіцієнт запізнювання, тобто величина R_f , що визначається відношенням відстані від старту до центру плями (AB) та відстані від старту до фронту рухомої фази (AC):

$$R_f = \frac{AB}{AC}. \quad (4.3)$$

Граничні умови: $1 > R_f > 0$. Фактор ємності (k') та величина R_f зв'язані наступним рівнянням:

$$k' = \frac{1 - R_f}{R_f}. \quad (4.4)$$

Для розділень, проведених на шарах дрібних часточок, плями повинні бути симетричними та компактними, а діаметр їх поступово збільшуватися із зростанням відстані, що вони проходять. За руху елюенту під дією капілярних сил в шарі сорбенту, що складається з дрібних часточок, розмивання зони обумовлене розміром часточок та молекулярною дифузією, тоді як вкладом масообміну можна знехтувати. Для шару з крупних часточок зазвичай плями витягнутої неправильної форми і в цьому випадку не можна не враховувати вплив масообміну на уширення плям. Розподіл аналізованої речовини в межах плями у випадку дрібних сорбентів в основному відповідає розподілу Гауса, і ефективність хроматографічної системи, що виражається числом теоретичних тарілок, описується наступним рівнянням (див. рис. 4.4):

$$N = 16 \left(\frac{n}{m} \right)^2, \quad (4.5)$$

де m – діаметр плями; $n = AB$. Слід відмітити, що рівняння (4.5) містить член, який залежить від пройденної відстані, а, отже, не є постійною величиною для шару сорбенту. Ефективність тонкого шару сорбенту прийнято вимірювати та розраховувати для речовини, R_f якої дорівнює 0,5.

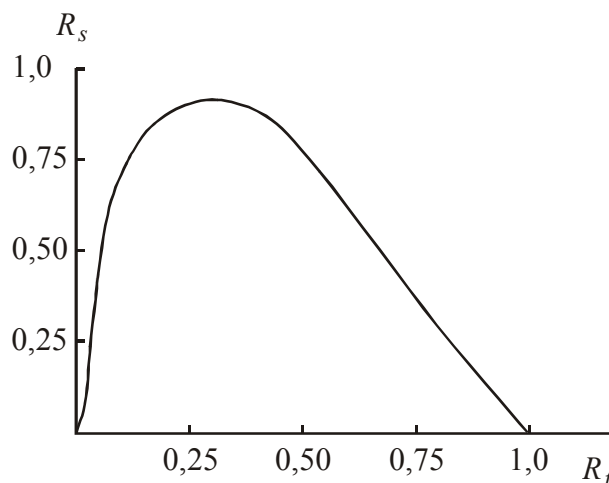
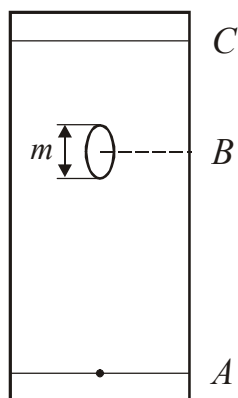


Рис. 4.4. Хроматограма у тонкому шарі

Рис. 4.5. Зміна розділення двох близько розміщених плям в залежності від R_f плями, що рухається швидше.

Рівняння для опису розділення в ХТШ, аналогічне класичному рівнянню для колоночної хроматографії, має вигляд:

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{k'_1}{k'_2} - 1 \right) \cdot \left(\frac{n}{\bar{k} + 1} \right)^{1/2} \cdot \left(\frac{\bar{k}}{\bar{k} + 1} \right), \quad (4.6)$$

де k'_1 та k'_2 - фактори ємності для плям 1 та 2; \bar{k} - середнє значення для k'_1 та k'_2 . Перший член рівняння (4.6) описує селективність системи, другий – якість шару, а третій – відносне положення плям на хроматограмі. На рис. 4.5 наведена залежність між розділенням двох плям, що розташовані близько одна до одної, та величиною R_f для компонента, що рухається швидше. Крива розділення фактично має форму дзвона з максимумом за величини R_f близько 0,3. В інтервалі величин R_f від 0,2 до 0,5 розділення незначно змінюється; в межах цього діапазону розділення складає більше 92% максимальної величини (75% для інтервалу R_f від 0,1 до 0,6). За межами цього діапазону розділення швидко знижується, при цьому спостерігається точна кореляція між роздільною здатністю методу ХТШ та положенням зон на хроматограмі.

4.2.1. Пластинки для ХТШ

Хроматографічно тонкі шари можна приготувати безпосередньо в лабораторії або ж скористатися готовими до вжитку тонкими шарами, що виробляються рядом фірм.

У лабораторії тонкі шари зазвичай наносять на скляні пластинки розміром від 20x20 до 5x20 см і товщиною 2-4 мм. В багатьох лабораторіях з успіхом використовують мініпластинки розміром 25x75 мм, виготовлені з покривного скла мікроскопа. Для препаративного розділення зазвичай використовують пластинки розміром від 20x20 до 20x100 см. Поверхня пластинок повинна бути чистою та знежиреною, краї пластинок неушкоджені. Для кращого зчеплення часточок сорбенту з скляною пластинкою, її робочу поверхню шліфують.

Розрізняють пластини з незакріпленим і закріпленим шарами сорбенту.

Для приготування пластини з незакріпленим шаром адсорбент потрібної активності насипають на скляну пластину, краще матову, і вирівнюють металевим валиком. У останнього на кінцях є потовщення в 0,5-1 мм ($\pm 0,01-0,02$ мм). У крайньому випадку можна скористатися скляною паличкою з двома відрізками гумової трубки на кінцях, переміщуючи її уздовж пластини. Відстань між потовщеними кінцями валика чи шматочками гумової трубки повинна бути на 10-12 мм менше, ніж ширина пластинки. Повільним переміщенням валика чи трубки по скляній пластині отримують рівний шар сорбенту, краї пластинки у завширшки у 5-6 мм вільні від сорбенту. Товщина незакріпленого шару адсорбенту залежить від товщини шматочків гумової трубки і складає приблизно 0,5-1 мм (рис. 4.6).

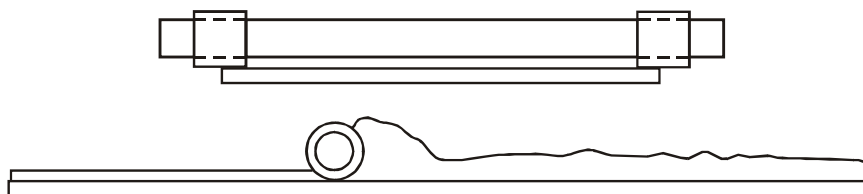


Рис. 4.6. Прилад для нанесення незакріплених шарів.

Для одержання закріпленого шару до сорбенту, який наноситься на основу, додають в'язучу речовину (гіпс медичний, штукатурний, рисовий та маїсовий крохмаль) в кількості до 5%. Приготування пластинки полягає в наступному: 1) підготовлюють вимиті та просушені пластинки підходящого розміру; 2) встановлюють прилад для нанесення шару; 3) готують сорбційну масу у вигляді суспензії з сорбенту, в'язучої речовини та дистильованої води, розрівнюють її за допомогою приладу по поверхні скляних пластинок; 4) сушать пластинки на повітрі за кімнатної температури на протязі 15 хв. На горизонтальній поверхні; 5) активують пластинки нагріванням у сушильній шафі протягом 1 години при 105-110⁰С або витримують їх на повітрі за кімнатної температури протягом доби.

В останні роки застосовуються пластини і плівки для ХТШ, які вигото-

влені із полімерної або алюмінієвої основи, на яку нанесений і міцно закріплений шар тонкодисперсного адсорбенту. Плівки відрізняються зручністю в роботі, високою відтворюваністю результатів, їх можна розрізати на потрібні по формату частки і зберігати проявлені хроматограми протягом тривалого часу.

4.2.2. Сорбенти та елюенти для ХТШ

Правильний вибір сорбенту та відповідної елюційної системи – це перший та найважливіший етап вирішення поставленої задачі. Тому необхідно досить детально знати властивості найбільш поширених в ХТШ сорбентів.

Силікагель. Основні властивості силікагелю, а також умови його застосування описані вище. Розмір часточок силікагелю, що застосовується у ХТШ, менше (2-40 мкм), ніж у часточок силікагелю, який застосовується у звичайній колоночній хроматографії. Розміри пор змінюються в межах 2-15 нм, а питома поверхня складає 300-600 м²/г. Від розміру часточок силікагелю залежить швидкість елюції, на силікагелі з крупнішими часточками вона вища. Порівняємо, наприклад, тривалість елюції на трьох зразках силікагелю з різними розмірами часточок (довжина шляху елюції в усіх трьох випадках дорівнює 10 см): 2-10 мкм – 45 хв; 10-30 мкм – 15 хв та 30-60 мкм – 8 хв. Однак із збільшенням розмірів часточок силікагелю зменшується чіткість розділення. Частіше за все використовують силікагель з додаванням 5-15% гіпсу. В деякі марки силікагелю вводять також флуоресцентний індикатор (сульфід кадмію чи 3% силікату цинку), що викликає флуоресценцію зеленого кольору в УФ-променях з довжиною хвилі 254 нм; деякі з хроматографованих сполук проявляються при цьому у вигляді темних плям. Сильнокислі елюенти, що містять мінеральні кислоти, розкладають цей індикатор. У склад деяких марок силікагелю входить також органічний індикатор, що реагує на опромінення з довжиною хвилі 366 нм. Недолік цього індикатора – його розчинність, деякі розчинники можуть його вимивати. На силікагелі, що містить гіпс, як правило вдається одержати краще розділення.

Виробляється також силікагель спеціально для препаративної ХТШ. Зазвичай він без в'язучого компонента, але містить один чи два флуоресцентних індикатори. Шари такого силікагелю не розтріскуються навіть при товщині 1,5 мм. Препаративне розділення можна проводити і на силікагелі, що використовується для аналітичних робіт, якщо це досить вузька фракція.

Оксид алюмінію. Сорбент з чітко вираженими адсорбційними властивостями (див. вище). Він поставляється головним чином у лужній формі (рН 8-10). Розміри часточок знаходяться у межах 5-40 мкм, розміри пор – 2-15 нм, питома поверхня – 100-350 м²/г. Деякі марки оксиду алюмінію випускають з добавкою 9-10% гіпсу, як в'язучого; оксид алюмінію, що містить в'язуче, виробляють у лужній та нейтральній (рН 7-7,5) формах, а такий, що

не містить в'язучого – ще й у кислій формі (рН 4). В деяких випадках в адсорбент вводять також флуоресцентний індикатор (254 нм). З препаративною метою застосовують слабколужний (рН 9) оксид алюмінію без в'язучої речовини, який містить індикатор другого типу (366 нм); з цього адсорбенту можна одержувати шари товщиною до 1,5 мм.

Силікат магнію випускають у вигляді часточок розміром 2-44 мкм; його рН приблизно дорівнює 10. Деякі виробники випускають силікат магнію, нейтралізований кислотами. Звичайний продажний адсорбент не містить ні в'язучого, ні флуоресцентного індикатора. Силікат магнію можна застосовувати для розділення сахарів, їх ацетатів, стероїдів, ефірних олій, антрахінонів, глікозидів тощо.

Поліаміди. Ці сорбенти виготовляють на основі перлону (нейлону 6) чи нейлону 11 та 66. Хроматографічні властивості окремих товарних марок поліамідів значно відрізняються, в залежності від властивостей вихідної сировини та ступеня полімеризації. Оскільки в присутності вільних іміногруп відбувається сильне зв'язування сполук деяких типів, наприклад ароматичних нітросполук та хінонів, поліаміди також випускають у ацетильованій формі. Перлон та нейлон 66 – гідрофільні матеріали, нейлон 11 гідрофобний. Зазвичай поліаміди для ХТШ не містять в'язучого, але часто містять добавку індикатора з короткохвильовою (254 нм) флуоресценцією. Випускаються і готові до вжитку скляні пластинки з шаром поліаміду. В'язучим у таких шарах слугує крохмаль, а флуоресцентним індикатором – силікат цинку в кількості 3%. Також випускають плівку з шаром товщиною всього 0,025 мм без в'язучого. Шари цих сорбентів характеризуються значною ємністю, їх можна регенерувати декілька разів. Поліаміди застосовують для розділення фенольних сполук, глікозидів флавоноїдів, глікозидів антрахінону, нуклеозидів, пестицидів.

Целюлоза, як і поліамід, відноситься до найбільш часто уживаних органічних сорбентів, особливо у розподільчій хроматографії. В ХТШ використовують два типи целюлози – природну волокнисту та синтетичну мікрокристалічну. Довжина волокон природної целюлози складає 2-25 мкм, а середній ступінь полімеризації коливається в межах 400-500. Часточки мікрокристалічної целюлози крупніші – 20-40 мкм, а ступінь полімеризації нижчий – 40-200. Крім того мікрокристалічна целюлоза хімічно чистіша, ніж природна. На чистій целюлозі проводять головним чином кількісний аналіз або розділення фосфорних кислот, фосфатів тощо. Більшість марок товарної целюлози випускається без в'язучого, оскільки адгезійні властивості її шарів набагато вищі, ніж у неорганічних сорбентів. В деякі марки целюлози додають флуоресцентний індикатор. Целюлозні тонкі шари використовують для розподільчої хроматографії гідрофільних речовин, наприклад спиртів, амінокислот, природних барвників, фосфатів тощо.

Ацетильовані целюлози (з різним ступенем ацетилювання) використовують в обернено-фазовій розподільчій хроматографії ліпофільних сполук –

антрахінонів, антиоксидантів, нітрофенолів, пероксидів, замінників цукру. При роботі з ацетильованою целюлозою потрібно мати на увазі, що вона розчиняється в галогеновмісних розчинниках, діоксані, кетонах та естерах. Адгезійні властивості ацетильованої целюлози гірші, ніж неацетильованої, тому, готуючи з неї тонкі шари, необхідно застосовувати в'язуче.

Іонообмінники. Сорбенти з іонообмінними властивостями використовуються в ХТШ все частіше. Використовують іонообмінні смоли та іонообмінні целюлози. Відстань між активними групами на поверхні макромолекул целюлози складає приблизно 5 нм, а на поверхні смоли – 1 нм. Через великі відстані між активними групами в целюлозі використовується лише невелика частина активних центрів, через те вибіркова десорбція може проходити в дуже м'яких умовах в порівнянні з хроматографією на іонообмінних смолах. Цим і пояснюється переважний вибір целюлоз при біохімічних дослідженнях та очистці дуже чутливих сполук.

Іонообмінні смоли зазвичай наносять на пластинки в суміші з целюлозою, що відіграє роль в'язучого. Деякі фірми випускають готові закріплені шари іонообмінних смол, нанесені на гнучку плівку. Перед вживанням їх потрібно витримати на протязі 16 год. у відповідному буферному розчині. Іонообмінні пластинки застосовують для розділення амінокислот, нуклеотидів, пуринів, піримідинів, неорганічних іонів, антибіотиків тощо.

Іонообмінники на основі полідекстрану, схожі за властивостями на іонообмінники на основі целюлози і мають ті ж самі межі застосування.

Пластинки для гель-хроматографії. За відповідного ступеня грануляції і застосування відповідної методики сефадекси також можна використовувати для виготовлення тонких шарів. Для утворення шарів підвищеної міцності до сефадексу додають 20% целюлози.

Інші сорбенти. Окрім перерахованих вище сорбентів в ХТШ застосовують інколи й інші матеріали, причому часто їх використовують в суміші з більш поширеними сорбентами. З числа неорганічних сорбентів використовують діатоміт (кізельгур), роль сорбентів можуть також виконувати оксиапатит, оксид магнею, активоване деревне вугілля. Наприклад, анасіл – суміш силікагелю і 15% оксиду магнею з в'язучим (10% гіпсу) чи без нього - селективно ділить ліпіди, які не вдається розділити на чистому силікагелі.

Елюенти для ХТШ. Оскільки адсорбентами в ХТШ можуть бути найрізноманітніші матеріали, більше того, механізми розділення також можуть бути абсолютно різними, узагальнити властивості окремих розчинників та їх сумішей, що застосовуються у методі досить складно. Співвідношення між природою сполук, що розділяються, та рухомою фазою, а також елюенти для різних типів хроматографії досить докладно описані вище. При виборі розчинника чи суміші розчинників для ХТШ необхідно враховувати розчинність проби в рухомій фазі, а також її полярність чи селективність. Під селективністю даного розчинника в порівнянні з іншим розчинником майже однакової полярності розуміють здатність першого селективно розчинити один з ком-

понентів суміші, що хроматографується. При розділенні методом ТХШ чистота розчинників, безумовно, має таке ж важливе значення, як і при розділенні іншими хроматографічними методами. Використовуючи суміші розчинників, слід пам'ятати про можливість розшарування цих сумішей і утворення другого фронту розчинника внаслідок контакту з нерухомою фазою.

4.2.3. Техніка виконання ХТШ

Нанесення проб зразків. Проби на ХТШ-платівку наносять у вигляді плями чи смуги, намагаючись забезпечити мінімальні розміри та однорідний розподіл проби у межах стартової зони. Необхідно уникати як перевантаження шару сорбенту, так і недовантаження його. Великі кількості проби дають занижену величину R_f , а дуже малі кількості можуть бути малопомітними. Оптимальний розмір плями для ХТШ 1-2 мм. Нанесення плям більшого розміру практично завжди погіршує розділення та призводить до еліптичної форми плям при хроматографуванні.

При нанесенні проби важливу роль грає розчинник. Ідеальний розчинник повинен добре розчиняти пробу, мати низьку в'язкість і бути досить летким, щоб швидко випаровуватися з пластинки. Окрім того він повинен змочувати шар сорбенту і мати слабку елюційну силу для даної проби на обраному сорбенті.

На приготовлений тонкий шар сорбенту на відстані 15-20 мм від його краю наносять мікропіпеткою (скляним капіляром, мікрометричним шприцом) розчин зразка в підходящому розчиннику концентрацією 1-5%. В одну точку можна нанести від 0,1 до 50 мкг речовини. В деяких випадках застосовують дуже розведені розчини і наносять 0,01-0,03 мкг.

Хроматографування пластинки. Після нанесення зразка розчиннику дають випаруватися і переносять пластину в камеру для прояву. Камерами для прояву слугують у випадку закріплених шарів вертикальні прямокутні скляні посудини з пришліфованою кришкою, а у випадку незакріплених - прямокутні скляні кювети з пришліфованими краями для щільного закривання скляною пластиною. Пластини з закріпленим шаром адсорбенту проявляють у вертикальному положенні, а з незакріпленим - в нахиленому, при цьому кут нахилу не повинний перевищувати 20° . Успіх хроматографування в значній мірі залежить від того, наскільки повно атмосфера в кюветі насичена парами розчинника. Насичення камери необхідно для зменшення випаровування з поверхні платівки, унаслідок чого розділення поліпшується. Насичення також зводить до мінімуму крайові ефекти. Для того, щоб насичення відбувалося ефективно, на стінки і дно камери поміщають смужки фільтрувального паперу. На дно кювети наливають розчинник і дають насититися атмосфері камери його парами. Платівку з адсорбентом і нанесеним зразком поміщають у камеру спочатку так, щоб шар рідини не торкався шару адсорбенту, і залишають на декілька хвилин, а потім нахилиють кювету так, щоб

розчинник почав усмоктуватися одним краєм тонкого шару адсорбенту. За рахунок капілярних сил розчинник рухається нагору по тонкому шару адсорбенту, проводячи хроматографування. Коли відстань від фронту розчинника до краю платівки стає рівною 0,5-2 см, хроматографування припиняють, платівку виймають із кювети, підсушують на повітрі і проводять проявлення плям.

Детектування. Більшість сполук, що хроматографуються, безбарвні, тому їх потрібно якимось чином виявляти після хроматографування. Методи виявлення можна поділити на декілька груп.

Фізичні методи виявлення застосовуються для виявлення сполук, що флуоресціюють при опроміненні світлом певної довжини хвилі, та сполук, що не флуоресціюють, але розділені на шарах сорбенту, який містить той чи інший флуоресцентний індикатор. В останньому випадку при УФ-опроміненні флуоресціює вся нерухома фаза, за виключенням зон сполук, що придушують флуоресценцію; ці сполуки виявляються, як темні плями на фоні, що флуоресціює.

Хімічні методи виявлення застосовуються найчастіше. За хімічного виявлення хроматограму після закінчення розділення обробляють газом чи паром, наприклад аміаком, хлором, бромом чи йодом, або обробляють різними неспецифічними чи специфічними проявляючими реагентами за допомогою пульверизатора. Реагентів для обприскування відомо досить багато (барвники, розчини деяких неорганічних солей, сірчана та хромово кислоти тощо).

Комбіновані методи виявлення дозволяють одержати значно більше інформації про досліджувану речовину. Деякі з цих методів дають можливість отримати дані про будову сполук, чи можуть бути використані для кількісної ХТШ. УФ-спектри поглинання і спектри флуоресценції можна одержати, безпосередньо досліджуючи хроматограми; за допомогою спеціально сконструйованого електроду можна отримати полярограму; розроблені також детектори для вимірювання інтенсивності флуоресценції тонких шарів під дією рентгенівського випромінювання.

За допомогою ХТШ можна проводити попередню ідентифікацію сполук. На платівку можна помістити відразу декілька зразків, тому на одній хроматограмі можна одержати плями і від суміші, що розділяється, і від передбачуваних компонентів цієї суміші. Якщо шлях, пройдений від старту двома речовинами однаковий, то це, хоча і не є доказом ідентичності, усе ж припускає значну частку імовірності ідентичності.

Особливо зручно за допомогою ХТШ підбирати оптимальні умови проведення процесу. Якщо проводиться реакція $X+Y=Z$, то хроматограма суміші буде складатися з трьох плям. Методом свідків можна установити, які плями відповідають речовинам X та Y , і закінчити реакцію тоді, коли Z буде найбільш інтенсивним, а X та Y зникнуть зовсім або будуть мати мінімальну інтенсивність.

4.2.4. Методи хроматографії у тонкому шарі

Метод безперервної елюції. Роздільну здатність ХТШ можна поліпшити, застосовуючи методи безперервної або багатократної елюції. Метод безперервної елюції найбільш корисний для поліпшення розділення пар компонентів, що погано розділяються за допомогою оптимізації селективності хроматографічної системи. В режимі безперервної елюції рухома фаза переміщується по ХТШ-пластинці тільки до певного місця, де вона безперервно випаровується. Випаровування зазвичай відбувається на межі пластинки з атмосферою і здійснюється природним чи вимушеним чином. На початку елюції рух фронту розчинника відбувається за рахунок капілярних сил, але як тільки фронт досягне межі, в дію вступають додаткові сили за рахунок випаровування елюенту. Нарешті, досягається стаціонарний стан, за якого швидкість руху елюенту постійна, і маса його, що випаровується на межі, дорівнює масі свіжої порції, що подається в шар. За мінімізації довжини пластинки, що використовується для розділення, швидкість рухомої фази залишається високою і за цих умов можна поліпшити селективність хроматографічної системи шляхом зменшення полярності розчинника, що використовується, не набагато збільшуючи час аналізу.

Метод багатократної елюції. При багатократній елюції елюент проходить по ХТШ-пластинці на певну відстань, після чого пластинку виймають з хроматографічної камери, дають розчиннику, адсорбованому на сорбенті, випаруватись, знову поміщають пластинку у камеру і повторюють процес хроматографії. Цей метод дає великі можливості для розділення складних сумішей, оскільки основні експериментальні параметри (довжина пластинки, час елюції за безперервної елюції, склад рухомої фази) можна змінювати на кожному кроці хроматографування; крім того, для одержання потрібного розділення можна також змінювати число кроків. Кількісні вимірювання можна проводити на різних кроках елюції, тому немає необхідності в тому, щоб усі компоненти були розділені в один і той же момент за умови, що кожен компонент відділяється від решти на якомусь кроці елюції. Окрім того порівняно недавно стали досяжними автоматичні пристрої для багатократної елюції. Багатократна елюція є важливим методом розділення сумішей, що містять речовини з дуже різною полярністю, для розділення яких не існує однієї системи розчинників. Кожен крок процесу може бути оптимізований незалежно для того, щоб одержати за один раз розділення лише декількох компонентів, і так до повного ступінчастого розділення усієї суміші.

Двовимірна хроматографія. Метод одновимірної елюції, безперечно є найбільш загальноприйнятим методом ХТШ. Іншими методами є двовимірна, кругова та антикругова хроматографія. У двовимірній ХТШ пластинку хроматографують послідовно у двох напрямках під прямим кутом один до другого, причому між елюціями пластинку висушують. Якщо для обох елюцій використовують одну і ту ж рухому фазу, то можна одержати лише не-

значне поліпшення розділення, що відповідає приблизно подвоєному числу теоретичних тарілок. Для того, щоб одержати суттєве збільшення розділення, необхідно так підібрати умови, щоб селективність рухомої фази була різною за елюції в обидва напрямки.

Кругова та антикругова хроматографія. Якщо пробу на ХТШ-пластинку наносити по колу недалеко від її центру, а рухому фазу подавати в центр цього кола, то такий метод елюції називають круговою хроматографією. Плями поблизу старту залишаються симетричними та компактними, в той час як розміщені поряд з фронтом розчинника стискаються у напрямку руху і витягуються під прямим кутом до цього напрямку. За антикругової елюції проба наноситься по колу зовнішнього круга поблизу країв пластинки і елюція відбувається в напрямку центру пластинки. Плями, які знаходяться поблизу старту, залишаються компактними, тоді як плями, що знаходяться поблизу фронту розчинника, суттєво витягуються в напрямку елюції, в той час як їх ширина, виміряна в напрямку, перпендикулярному руху, змінюється дуже незначно. Унікальними особливостями антикругової хроматографії є висока швидкість та можливість використання великих навантажень.

4.2.5. Мікропрепаративна хроматографія в тонкому шарі

Препаративне розділення сумішей речовин проводять як на закріплених, так і незакріплених шарах сорбентів. Для розділення на закріплених шарах зазвичай використовують пластинки з доданими до сорбенту флуоресцентними індикаторами. Плями речовин виявляють в УФ-світлі, відмічають, вишкрябують, і речовину вимивають з сорбенту підходящим розчинником. Хроматографування проводять декілька разів, і розчини, одержані при вимиванні однакових плям, об'єднують. Після видалення розчинника виділяють індивідуальні сполуки. На звичайну пластинку (20x20 см) з флуоресціюючим шаром силікагель-гіпс суміш речовин (до 50 мг) можна нанести у вигляді безперервної лінії. У цьому випадку окремі сполуки виявляються як смуги, котрі відмічають та обробляють, як описано вище.

Особливо зручний метод препаративного розділення сумішей речовин в кількостях 0,1-1 г на незакріплених шарах оксиду алюмінію чи силікагелю товщиною 1,5 - 3 мм. Розділення проводять на пластинках різних розмірів, наприклад 20x40 см. За шару товщиною 1,5 мм зазвичай на 1 см стартової лінії наносять 20-25 мг суміші. Пробу розчиняють в підходящому розчиннику та наносять у вигляді суцільної лінії, після чого просочують чистим розчинником для більш глибокого проникнення суміші у шар сорбенту. Розчинник випаровують і хроматографують суміш у підходящій рухомій фазі.

Виявити адсорбційні смуги можна хімічним методом, необхідно лише прикрити більшу частину платівки скляними смужками або спеціальним пластиковим трафаретом, залишивши незахищені смуги шириною 2-8 мм, перпендикулярні до фронту розчинника. На незахищених ділянках прово-

дять проявлення, а з захищених ділянок збирають адсорбент у місцях, що є продовженням адсорбційних зон, пристроєм, зображеним на рис.4.7. У скляний фільтр Шотта (№3-4) вставляють корок з вигнутою трубкою, нижній кінець фільтра під'єднують до вакууму водоструменевого насоса. Сорбент з речовиною всмоктується з пластинки через трубку за допомогою вакууму. У цьому ж фільтрі речовину вимивають підходящим розчинником, розчинник потім відганяють. У деяких випадках такий метод виділення є єдино можливим.

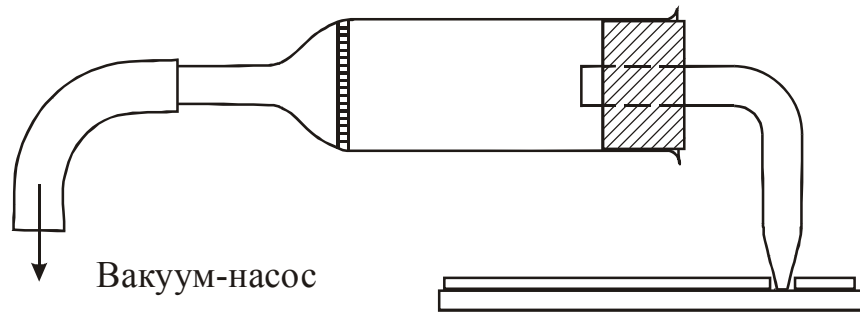


Рис. 4.7. Прилад для відсмоктування адсорбенту з речовиною.

За допомогою ХТШ можна підбирати умови для препаративного поділу на колонку. Необхідно лише пам'ятати, що у випадку оксиду алюмінію при ХТШ розчинник повинний бути дещо більш полярним, чим при поділі тих же речовин методом колоночної хроматографії.

4.2.6. Скануюча денситометрія

Людське око може виявити на ХТШ-пластинці в кращому випадку близько 1-10 мкг забарвлених компонентів з відтворюваністю не ліпше ніж 30%. Видалення з пластинки розділених плям, що містять аналізовані речовини, екстракція чи елюція їх з сорбенту і визначення за допомогою фотометрії розчину потребує багато часу і не завжди дає вірний результат. Свій вклад у проблему вносять також труднощі з визначенням краю плями при візуальному спостереженні, неповна екстракція проби з сорбенту та неспецифічне фонове поглинання через присутність колоїдних часточок сорбенту в розчині, що аналізується. Окрім того, описаний вище процес дуже незручний для того, щоб розглядати його як прийнятний спосіб детектування у швидкісному хроматографічному методі – так званій високоефективній хроматографії у тонкому шарі (ВЕХТШ). Прилади для визначення речовин безпосередньо на ХТШ-хроматограмах з'явилися у 1967 р. і у наш час вважаються необхідними для правильного визначення розмірів та положення плями, точного вимірювання розділення, швидкого та коректного кількісного аналізу.

Визначення речовин безпосередньо на ВЕХТШ-пластинках може бути здійснене за допомогою ряду методів: відбиття, пропускання, одночасно відбиття та пропускання, гасіння флуоресценції та флуоресценція. Світло, що падає на поверхню пластинки, основа якої виготовлена з полімерного мате-

ріалу, частково пропускається та частково дифузно розсіюється шаром сорбенту. Світло, що падає на пляму на пластинці, поглинається, тому інтенсивність пропущеного чи відбитого світла зменшиться за тих довжин хвиль, які утворюють спектр поглинання плями. Основу кількісного визначення за допомогою поглинання світла складає вимірювання різниці між інтенсивністю пропускання чи відбиття світла, що попадає на зону пластинки, яка не містить проби, та інтенсивністю світла, яке попадає на зону, яка містить пробу.

Вимірювання поглинання можна також здійснювати за умов гасіння флуоресценції. У цьому випадку користуються спеціальними ВЕХТШ-пластинками з шаром сорбенту, що містить флуоресцентний індикатор. Коли таку пластинку піддають дії короткохвильового УФ-випромінювання, плями, що поглинають УФ-випромінювання, виглядають темними на фоні яскравої флуоресценції шару сорбенту пластинки. У цьому випадку можна уявити, що плями проб діють як УФ-фільтри: плями поглинають деяку кількість збуджуючого випромінювання, зменшуючи тим самим інтенсивність флуоресценції в зонах проб на пластинці. Тому вони виглядають темнішими на фоні решти пластинки. Використовуючи цей процес, візуально можна розрізнити тільки ті речовини, спектри поглинання яких накладаються на спектр випромінювання флуоресцентного індикатора. Гасіння флуоресценції слід в основному розглядати як метод виявлення плям. Він має меншу специфічність та чутливість в порівнянні з методом визначення поглинання, що частково пов'язане із значними коливаннями випромінювання флуоресценції через неоднорідність розподілу флуоресцентного індикатора в шарі сорбенту.

Основна різниця між поглинанням і флуоресценцією полягає в тому, що у випадку флуоресценції УФ-випромінювання, що освітлює пластинку, слугує лише для збудження молекул досліджуваної речовини, які потім випромінюють вторинне випромінювання з більшою довжиною хвилі, ніж збуджуюче. В першому наближенні зони пластинки, що не містять компонентів проби, можна розглядати як "темний фон" і нульову лінію, рівну та вільну від шуму, причиною якого є неоднорідне розсіювання на шарі сорбенту. Отже, зони проб виступають у ролі точкових джерел, нанесених на цей "темний фон". З теоретичної та практичної точки зору, це суттєво полегшує вирішення проблем кількісного аналізу.

Прилади для скануючої денситометрії, що надходять у продаж, мають багато спільного. Для того, щоб охопити весь діапазон УФ-видимого випромінювання в межах 200-800 нм, необхідно використовувати різні лампи як джерела світла. Видиме випромінювання одержують на галогенових чи вольтфрамкових лампах, а УФ-випромінювання – на дейтерієвих лампах. Для флуоресцентного аналізу віддають перевагу високоінтенсивним ртутним чи ксеноновим дуговим лампам. Вибір аналітичної довжини хвилі здійснюють за допомогою монохроматора чи фільтра. В денситометрах з фільтрами зазвичай використовують ртутні лампи і фільтри, що пропускають тільки випромінювання, яке відповідає окремим довжинам хвиль джерела. Перевага

цих приладів у низькій ціні. Однак, з іншої сторони, широкосмугові джерела випромінювання та дифракційні монохроматори забезпечують більшу універсальність при оптимізації підбирання аналітичної довжини хвилі. При вимірюванні флуоресценції довжина хвилі збудження також вибирається за допомогою фільтра чи монохроматора. Між детектором та пластинкою розміщують фільтр з обмеженою смугою пропускання, котрий пропускає випромінювання з довжиною хвилі випромінювання, але послаблює випромінювання з довжиною хвилі збудження. Якщо необхідна більша селективність, фільтр з обмеженою смугою пропускання можна замінити на інтерференційний фільтр, хоча при цьому дещо знижується чутливість. Для вимірювання сигналів зазвичай використовують фотомножники чи фотодіоди.

У сучасних скануючих денситометрах в основному застосовуються три оптичних схеми (рис. 4.8). Найпростішою є однопроменева схема, яка дає можливість отримувати чудові кількісні результати, але при її застосуванні можуть виникати труднощі через несправжній фоновий шум, обумовлений флуктуаціями вихідного сигналу джерела, нерівномірностями розподілу сторонніх поглинаючих домішок та неоднорідністю поверхні пластинки.

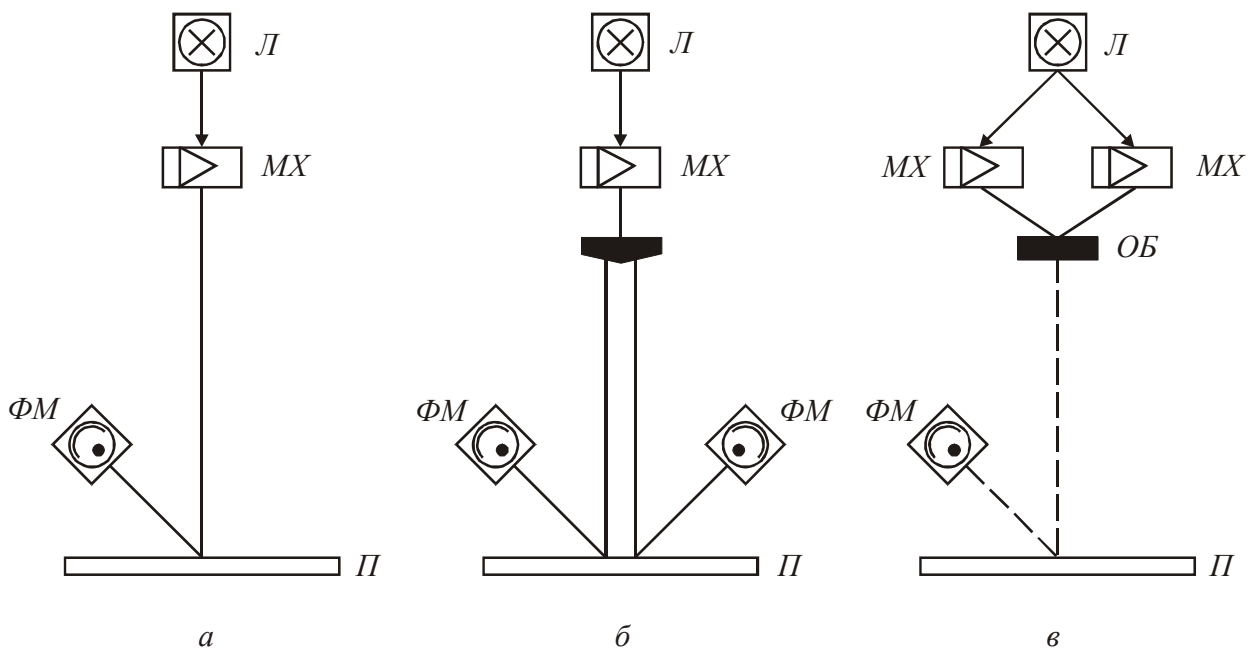


Рис.4.8. Оптичні схеми скануючих денситометрів: *a* – однопроменева; *б* – однохвильова двопробенева з розділенням у просторі; *в* – двохвильова однопроменева з розділенням у часі. *Л* – джерело; *МХ* – монохроматор; *ОБ* – обтюратор; *ФМ* – фотомножник, *П* – ВЕХТШ-пластина.

Фонові перешкоди можна до деякої міри компенсувати, використовуючи двопробеневу схему. Два промені можна розділити у часі на одній і тій самій точці пластинки, або розділити у просторі та зареєструвати за допомогою двох детекторів. У двопробеневій оптичній схемі з розділенням в просторі один промінь монохроматичного світла розділяється на два, котрими сканують різні ділянки пластинки. Одним променем сканують ділянку пластинки

тинки з пробєю, в той час як інший проходить по області пластинки, що не містить проби. Обидва промені послідовно детектуються за допомогою спарених фотомножників, сигнал-різниця подається на самописець, і таким чином компенсується флуктуація вихідного сигналу джерела. Хоча два промені падають на різні області пластинки, тим не менше невеликі неоднорідності на поверхні пластинки, і небажаний фон, обумовлений домішками, які містяться у шарі сорбенту, все ще можуть створювати труднощі.

При використанні однопроменевої двохвильової схеми флуктуації, викликані розсіюванням випромінювання з довжиною хвилі поглинання (λ_1), компенсуються за допомогою віднімання флуктуацій, що спостерігаються для випромінювання з іншою довжиною хвилі (λ_2), яке не поглинається плямами, але розсіюється так само, як і випромінювання з λ_1 . Два промені модулюються за допомогою обтюратора та об'єднуються в один промінь, для подачі сигналу-різниці на детектор. Хоча коефіцієнт розсіювання в невеликому ступені залежить від довжини хвилі, однак корекція фону буде ліпшою, коли величини λ_1 та λ_2 будуть по можливості майже однаковими. Цю вимогу часто здійснити дуже важко, оскільки зазвичай спектри поглинання включають широку смугу довжин хвиль і цілком може й не бути двох довжин хвиль, за однієї з яких спостерігається поглинання, а за іншої – ні. Однак за сприятливих обставин корекція фону у цій схемі може бути дуже гарною.

У всіх сучасних денситометрах положення променя, що сканує пляму проби, зафіксовано, а пластинка сканується шляхом встановлення її на рухому платформу, що рухається за допомогою крокових двигунів. За лінійного сканування, пластинка на платформі, що переміщається кроковими двигунами, проходить під променем у напрямку, перпендикулярному щілині. Кожен період сканування тому є доріжкою, довжина якої визначається відстанню, яку пройшла проба, а ширина обумовлюється розмірами щілини. Деякі прилади дають можливість здійснювати зигзагоподібне, радіальне та кругове сканування.

4.2.7. Паперова хроматографія

Метод паперової хроматографії (ПХ) був відкритий у 1944 р. Консденом, Гордоном, Мартіном і Сінджем, котрі розробили та застосували його для аналізу білкових гідролізатів, тобто амінокислот. Однак з 1952 року ПХ почала поступово витіснятися хроматографією у тонкому шарі. У наш час ХТШ використовується приблизно у 5-7 разів частіше, ніж ПХ.

Як і хроматографію взагалі, ПХ можна розділити на розподільчу, адсорбційну та іонообмінну, а також аналітичну та препаративну. За характером методики виконання розрізняють проточну (безперервну) хроматографію,

повторне хроматографування, коли хроматографічний процес переривають при досягненні певного положення фронту розчинника, хроматограму сушать, після чого знову проводять хроматографування (часом по декілька разів) з цією ж чи іншою системою розчинників, і нарешті одно- та двовимірну, кругову та центрифугійну хроматографію, а також хроматографію на папері клиноподібної форми. В розподільчій хроматографії можна виділити нормально- та обернено-фазову хроматографію.

Хроматографічним папером називають целюлозний фільтрувальний папір, що відрізняється особливою чистотою вихідної сировини та деякими особливими властивостями, а також інші типи паперу, наприклад папір з модифікованої целюлози, скловолкна тощо. Інша важлива особливість хроматографічного паперу полягає в наступному: нанесена на нього рідина переміщується під дією капілярних сил по капілярах, утворених волокнами паперу. Кількісно ця характеристика паперу визначається швидкістю, з якою розчинник проникає в капіляри, та кінцевою висотою підйому. Ці характеристики капілярного підйому залежать від густини та густоти сітки волокон паперу. Чим папір цупкіший (а значить менш проникний і менш прозорий) тим нижчі характеристики капілярного підйому.

Апаратура для проведення ПХ розрізняється за розміром та формою, в залежності від методу хроматографування (висхідне, спадне, кругове, двовимірне, препаративне). В найпростішому вигляді це високі циліндричні посудини з щільними кришками. Часом на внутрішній стороні кришки є гачок для підвішування смужок паперових хроматограм. Стінки посудини на всю висоту вкриті фільтрувальним папером для створення відповідної атмосфери, насиченої парою рухомої фази.

Пробу на паперову хроматограму наносять капілярними піпетками. При цьому потрібно слідкувати, щоб плями не виходили ні завеликими, ні замалими. Зазвичай наносять 5-10 мкл 5-20% розчину у підходящому розчиннику, тобто кількість речовини в одній плямі складає 0,01-0,3 мг.

Щоб результати хроматографування на папері були надійними та відтворюваними, необхідні дуже чисті елюенти з постійними характеристиками. При підборі розчинника для ПХ слід керуватися тими ж загальними правилами, що й при підборі розчинника для колоночної чи площинної адсорбційної хроматографії.

Виявляють хроматограму аналогічно ХТШ, забарвлені – візуально, безбарвні – будь-яким зручним фізичним або хімічним методом.

4.3. Газова хроматографія

Газова хроматографія – різновид хроматографічних методів, у котрому рухомою фазою (або проявляючою речовиною в адсорбційній хроматографії)

завжди є газ. У залежності від системи, в якій проводиться хроматографування, розрізняють газову адсорбційну хроматографію (у системі газ – тверде тіло) і розподільчу (у системі газ – рідина) або газорідинну хроматографію.

Газова адсорбційна хроматографія (ГАХ) переважно застосовується у аналізі низькомолекулярних сполук, що за звичайних умов перебувають у газовому стані. При дослідженні органічних сполук частіше усього застосовується газорідинна хроматографія (ГРХ), тому тут будуть розглянуті принципи і межі придатності саме цього виду хроматографії.

При хроматографії в системі газ - рідина використовують прийоми тільки елюційної хроматографії. У відповідності з методикою хроматографії невеликий об'єм суміші, що аналізується, вводять у хроматографічну колонку однією порцією. Шляхом пропускання газу-носія відбувається проявлення хроматограми, тобто послідовна елюція чистих компонентів із колонки і виявлення їх спеціальним пристроєм – детектором. Хроматографічний поділ відбувається за рахунок багаторазово повторюваних актів перерозподілу речовини між рухомою газовою фазою і нерухомою рідкою фазою, закріпленою на інертному носії.

4.3.1. Блок-схема приладу для газорідинної хроматографії

Газорідинний хроматограф (рис. 4.9) складається з блоку підготовки газів 2, дозатора з випаровувачем 3, хроматографічної колонки 4 у шафі термостата 5, програматора температури 6, детектора 7, вимірювача малих струмів 8 і самописця 10. До складу приладу може входити й інтегратор 9. Для забезпечення нормальної роботи хроматографа необхідні джерела стиснутого газу 1, тобто газу-носія, а також, якщо потрібно, стиснутого повітря (кисню) і водню.

Джерело газу-носія 1 і блок підготовки газів 2. Газу, що виконують роль рухомої фази, обирають в залежності від типу детектора, що використовується. Вони повинні бути інертними по відношенню до компонентів нерухомої фази та проби, яка аналізується. Газу-носії як правило зберігають у балонах під тиском. Найчастіше використовують наступні газу-носії: очищений від кисню **азот** (переваги – низька вартість, проста очистка, безпечність у роботі; недоліки – відносно висока в'язкість, а отже високий і гідравлічний опір хроматографічних колонок, низька теплопровідність); електролітичний **водень** (переваги – висока теплопровідність, низька в'язкість, а отже низький перепад тиску в колонці, низька вартість; недоліки – значна дифузія компонентів, що розділяються, небезпека вибуху при витіканні); **гелій** (переваги – ті ж, що у азоту та водню; недолік – висока вартість); аргон (переваги – відносно низька ціна, проста очистка; недолік – відносно висока в'язкість). Інші газу, такі як двоокис вуглецю, неон, метан чи аміак, використовуються рідше.

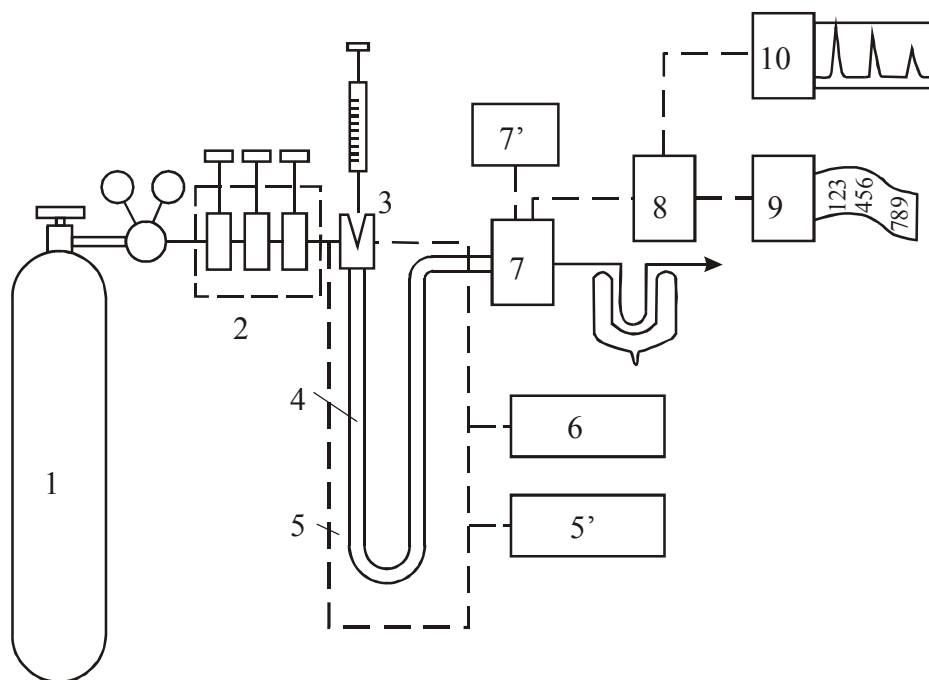


Рис. 4.9. Блок-схема газорідинного хроматографа: 1 – джерело стиснутого газу; 2 – блок підготовки газів; 3 – дозатор з випарником; 4 – колонка; 5 – термостат; 5' – блок живлення термостата; 6 – програматор температури; 7 – детектор; 7' – блок живлення детектора; 8 – вимірник малих струмів; 9 – інтегратор; 10 – самописець.

Блок підготовки газів (БПГ) складається з фільтрів, регуляторів постійного тиску та регуляторів постійної витрати. Регуляторами постійного тиску задають тиск газу-носія чи допоміжного газу у хроматографі, а регулятором постійної витрати (голчастим вентилям) – постійну об'ємну швидкість газу. Окрім того у блок входять манометри для контролю за тиском у газовій системі та зразкові манометри для контролю за тиском у колонці.

Збільшення швидкості газу-носія скорочує час утримування і тим самим прискорює хроматографію, але зростання вихрової дифузії та дифузії масообміну, що уширюють хроматографічні зони і погіршують розділення, вимагає підтримування оптимальних швидкостей, що підбираються дослідним шляхом. Орієнтовано величини швидкості складають 5-10 см/с або 40-80 мл/хв для набивної колонки внутрішнім діаметром 2-4 мм. Величина тиску у колонці також впливає на якість хроматографічного розділення.

Дозатор з випаровувачем. З системи вводу проби починається будь-який хроматографічний процес. Будь-яка система вводу проби повинна задовольняти трьом загальним вимогам: 1) вносити мінімальне розмивання хроматографічних зон; 2) забезпечити максимальну точність та відтворюваність кількості зразка, що дозується в колонку; 3) зберігати незмінність кількісного та якісного складу суміші до та після дозування.

Дозатор для газоподібних речовин, являє собою багатоходовий кран, виготовлений з корозійностійкої сталі та фторопласту (рис. 4.10). У першій позиції такого крану (рис. 4.10, а) дозувальна петля заповнюється газовою

пробою за певного відомого тиску; при повороті крана у другу позицію (рис. 4.10, б) проба поступає в колонку. Петлі змінні, підбираючи петлю відповідного об'єму легко регулювати розмір проби, що вводиться в колонку.

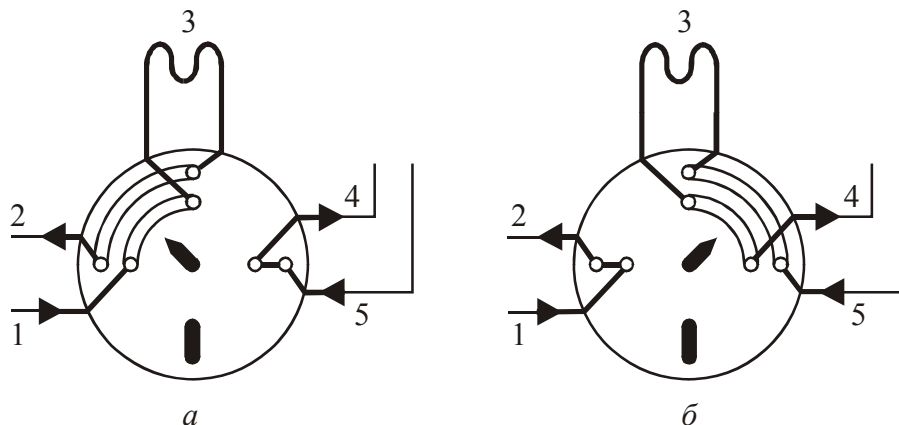


Рис. 4.10. Газовий кран-дозатор: 1 – подача проби; 2 – скидання надлишку проби; 3 – калібрований дозований об'єм; 4 – до колонки; 5 – подача газу-носія.

Пробу рідкої речовини вводять у дозатор, зображений на рис. 4.11. Дозатор сконструйований таким чином, що проколюючи прокладку з термостійкої силіконової гуми 3 голка проходить і упорскує вміст шприца безпосередньо в початок колонки 2. Ця ділянка колонки, як і металевий корпус дозатора 1, нагрівається керамічним нагрівальним елементом 4. Газ-носіє, проходячи вузьким каналом між корпусом і колонкою, також устигає нагрітися до температури, достатньої для швидкого випаровування рідкої проби. Таким чином забезпечується мінімальне розмивання хроматографічної зони. Для аналітичних хроматографів застосовують шприци на 1 або 10 мкл у залежності від діаметра колонок.

Тверді речовини вводять у хроматограф у вигляді розчину в легколеткому розчиннику. Однією з проблем дозування є точне і відтворюване уведення визначеної кількості речовини. Якщо точності, що її забезпечує градуирований мікрошприц, недостатньо, усереднюють результат від декількох уведень зразка. У залежності від летучості зразка температуру у випаровувачі можна встановити в інтервалі 50-450°C. Слід пам'ятати, що температура випаровувача повинна на 20-30° перевищувати найвищу робочу температуру колонки.

Колонки. Хроматографічні колонки підрозділяються на набивні і капілярні. Набивні колонки – трубки з внутрішнім діаметром 1-10 мм і довжиною 0,5-10 м.

Найбільше уживані колонки діаметром 3-4 мм довжиною 1-3 м. Колонки довжиною до 1 м можуть бути U-подібними, але найбільш поширеною формою колонок є спіральна. Радіус спіральних колонок прагнуть зробити якнайбільшим, щоб зменшити дифузію, що уширює піки. У всякому разі радіус спіралі повинен мінімум у 20 разів перевищувати внутрішній діаметр колонки.

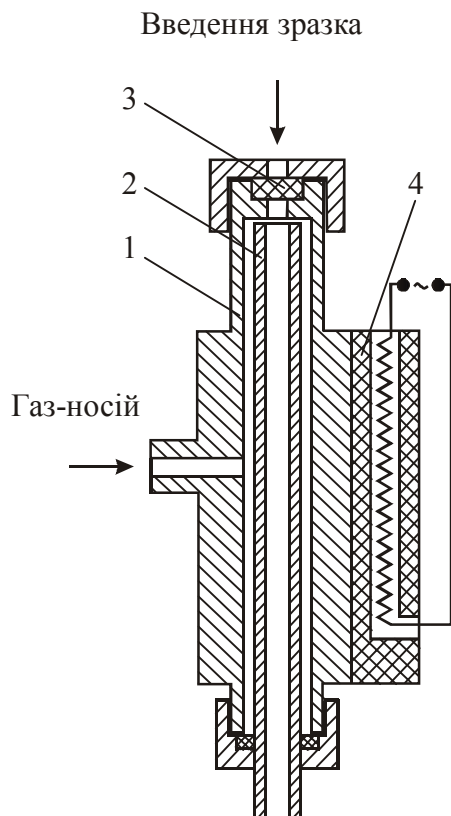


Рис. 4.11. Принципова схема дозатора з випаровувачем: 1 – металевий корпус; 2 – колонка; 3 – прокладка з термостійкої гуми; 4 – керамічний нагрівач.

Набивні колонки заповнюють **твердим носієм**, що повинний забезпечити найбільше ефективне використання рідкої фази. Характер застосування диктує наступні вимоги до носія:

- а) мала питома поверхня;
- б) низька адсорбційна здатність стосовно речовин, що розділяються;
- в) відсутність каталітичної активності;
- г) достатня механічна тривкість і малий опір потокові газу.

Твердими носіями слугують гранульовані матеріали з високою пористістю. Щоб виключити можливість адсорбції, використовуються матеріали з питомою поверхнею 1-7 м²/г. Середній діаметр пор, що відповідає такій питомій поверхні дорівнює 0,1-1 мкм. Питома вага таких матеріалів зазвичай лежить у межах 2-2,4 г/мл, а об'ємна маса складає 0,2-0,4 г/мл. Важливою характеристикою носія є його об'єм пор; у гарного носія він дорівнює приблизно 1 мл/г.

Кращим і найбільш дешевим матеріалом, із якого виготовляють тверді носії, є діатоміт (діатомова земля) - осадовий матеріал із панцирів діатомових водоростей, що складаються в основному з кремнезему. У залежності від місця видобутку діатоміту, характеру механічної, хімічної і термічної обробки ці носії набувають різних властивостей: питомою поверхню, сорбційну і ката-

Найбільше уживаними матеріалами для виготовлення колонок є корозійностійка сталь і скло, хоча часом колонки виготовляють з тефлону, поліпропілену чи міді. Колонки із сталі міцніші, простіші в експлуатації, легше під'єднуються до газових комунікацій, однак можуть викликати каталітичний розклад деяких речовин. Скляні колонки зручніші, оскільки дозволяють візуально контролювати якість заповнення та стан набивки колонки.

Якщо діаметр набивної колонки менше 2 мм, то таку колонку називають мікронабивною. Останні більш ефективні, ніж звичайні набивні колонки, за рахунок прискорення процесу радіального перемішування та відповідного зниження впливу на ефективність неоднорідностей по перерізу колонки.

лективність хроматографічного розділення. Нерухома фаза повинна відповідати наступним вимогам: бути селективною, хімічно стійкою й інертною в умовах застосування, мати низький тиск пари при робочих температурах, низьку в'язкість, бути досить чистою і доступною.

Нерухому фазу зазвичай наносять на носій у кількості 3-30%. Варто мати на увазі, що зменшення кількості НРФ з одного боку, зменшує ВЕТТ, тобто збільшує ефективність, з іншого боку, знижує селективність хроматографічної системи. У кожному випадку існує оптимальна кількість нерухомої фази, коли розділення найкраще.

Рекомендована межа тиску пари рідкої фази – не більше 50 Па при робочій температурі. При цьому втрати рідкої фази при максимальній температурі не будуть перевищувати 0,1% за годину. Таким чином, верхня межа робочої температури нерухомої фази визначається її летучістю і може досягати 400-500°C, нижня - це температура затвердіння фази.

Метод нанесення нерухомої фази повинний забезпечувати максимально можливу рівномірність товщини плівки на нерухомому носії. Це досягається в такий спосіб: рідку фазу розчиняють у леткому розчиннику, просочують носій і підсушують. Промисловістю налагоджений випуск носіїв із уже нанесеною нерухомою фазою, що значно полегшує роботу хроматографіста, адже свіжо нанесена фаза вимагає багатогодинного кондиціонування за температур, близьких до верхньої межі її використання.

Полярність фази безпосередньо впливає на порядок виходу компонентів із хроматографа. Якщо аналізують неполярні речовини на неполярній фазі, то часи утримування збільшуються з ростом температур кипіння. На полярних фазах відіграють роль сили міжмолекулярної взаємодії, наприклад, водневий зв'язок. Так, суміш метил-, диметил- і триметиламіну при хроматографії на неполярній фазі виходить у порядку росту температур кипіння, тобто першим виходить метиламін, у той же час на гліцерині порядок виходу змінюється на зворотний. Найбільше часто застосовувані НРФ, температурний інтервал і характер аналізованих сумішей наведені в табл. 5.6.

Капілярні колонки на відміну від набивних не розраховані на твердий носій. Нерухома рідка фаза в них розподілена тонким шаром по стінках капіляра, діаметр котрого звичайно складає 0,1-0,5 мм.

Вимоги до сталості форми (коло) і розмірів внутрішнього перетину високі. Зменшення питомої поверхні на одиницю довжини компенсується збільшенням довжини колонки: розмір капіляра складає 10-300 м. Як і для набивних колонок, найкращим матеріалом для капілярних колонок служить сталь і скло (у тому числі кварцове). Необхідність гарного змочування стінок капіляра рідкою фазою вимагає спеціальної підготовки його внутрішньої поверхні. Скляні капіляри, наприклад, промивають соляною кислотою, травлять плавиковою кислотою, силанізують триметилхлорсиланом чи гексаметилдисилазаном тощо. Для нанесення рідкої фази розчин останньої в підходящому леткому розчиннику промивають через капіляр, після чого че-

рез колонку пропускають газ-носії чи азот, видаляючи надлишки НРФ і розчинника. В залежності від способу нанесення розділяючого шару розрізняють наступні типи капілярних колонок:

1. ВКК – відкриті капілярні колонки (WCOT – Wall Coated Open Tubular), у яких тонка плівка нерухомої фази нанесена безпосередньо на внутрішню поверхню колонки. Товщина плівки у цих класичних колонках складає 0,01-1 мкм.

2. ВКК-ТН – відкриті капілярні колонки з твердим носієм (SCOT – Support Coated Open Tubular), на внутрішніх стінках яких знаходиться шар твердого носія (наприклад графітованої сажі чи дуже дрібних часточок легкоплавкого скла), на який наносять НРФ. Товщина шару складає 1-5 мкм.

3. ВКК-ПШ – відкриті капілярні колонки з пористим шаром (PLOT – Porous Layer Open Tubular), на внутрішні стінки яких нанесений чи одержаний хімічним шляхом пористий шар товщиною 10 та більше мкм. Колонки цього типу застосовуються для ГАХ. Пористий шар може бути утворений шаром силікатних сорбентів, графітованої сажі, активованого вугілля, молекулярних сит, солей та оксидів металів тощо.

4. ВСКК – відкриті спіральні капілярні колонки (HCOT – Helically Coiled Open Tubular), у яких нерухома фаза нанесена на внутрішню поверхню капілярної колонки, всередині якої є гвинтоподібна спіральна стрічка, призначена для турбулізації потоку газу-носія.

5. Колонки з хімічно зв'язаною нерухомою фазою, у яких на відміну від класичних капілярних колонок ВКК, внутрішня поверхня капіляра хімічно модифікована нерухомою фазою. Капілярні колонки з хімічно зв'язаною нерухомою фазою характеризуються наступними перевагами: більша стабільність та відтворюваність характеристик у часі; більша термостабільність; можливість введення великих рідких проб безпосередньо в колонку. Зважаючи на той факт, що найлегше хімічно модифікується поверхня капілярів, виготовлених з кварцового скла, можна сказати, що майбутнє капілярної хроматографії саме за такими колонками.

Термостат колонок і програматор температури. Через те, що швидкість елюції залежить від температури, колонку поміщають в термостат 5 (рис. 4.9), що представляє собою термоізолювану шафу, обладнану нагрівальними елементами, датчиком терморегулятора і вентилятором для рівномірного обігріву і швидкого охолодження. Точність підтримки температури складає $\pm 0,1-0,2^{\circ}\text{C}$ в інтервалі температур $50-400^{\circ}\text{C}$. У термостаті колонок можна підтримувати ізотермічний режим, режим рівномірного підйому температури з заданою швидкістю або задавати програмою зміну режимів у необхідній послідовності за допомогою програматора температури 6.

Детектори. Після виходу з хроматографічної колонки газова суміш надходить у детектор 7. Хроматографічний детектор являє собою пристрій, що дозволяє фіксувати яку-небудь фізико-хімічну властивість аналізованої

суміші, що залежить від її складу. Хроматографічний детектор повинен відповідати наступним умовам:

1) фізико-хімічна властивість компоненту, що її аналізує детектор, повинна різко змінюватися із зміною складу рухомої фази. Інакше кажучи, детектор повинен мати високу чутливість до компонентів, що аналізуються;

2) ця властивість повинна змінюватися пропорційно концентрації речовини, що визначається. Така пропорційність бажана для всіх компонентів з метою спрощення розрахунку складу суміші;

3) аналізовані компоненти детектор повинен реєструвати по можливості миттєво, тобто потрібно забезпечити достатньо швидку дію детектуючої системи;

4) робочий об'єм детектуючої системи повинен бути якнайменшим щоб не викликати додаткового позаколоночного розмивання хроматографічних зон у системі детектування;

5) оскільки фізико-хімічні властивості газових та рідких сумішей залежать також від температури, тиску та інших параметрів хроматографічного експерименту, то ці параметри необхідно підтримувати постійними на протязі аналізу або застосовувати детектори, результати вимірювань яких практично не залежать від експериментальних параметрів.

Детектор характеризується **чутливістю, порогом детектування (ПД)** та **рівнем флуктуаційних шумів**. Чутливістю детектора зазвичай називають відношення вихідного сигналу до вхідного, котрий визначається кількістю речовини, що поступає в детектор. Для диференційних детекторів вихідний сигнал має форму піка, причому цей сигнал визначається висотою чи площею піка. Сигнал детектора, а отже і його чутливість можна збільшити за рахунок електронної схеми. Тому чутливість детектора не є достатньою характеристикою для оцінки тієї мінімальної кількості речовини, що її детектор здатен надійно та відтворювано реєструвати, причому підвищення чутливості не завжди призводить до зниження цієї мінімальної кількості речовини. В зв'язку з цим вводиться ще одна величина, що характеризує чутливість детектора, котра називається порогом детектування. Поріг детектування – це мінімальний вміст речовини у рухомій фазі, доступний виявленню хроматографічним детектором. Прийнято вважати поріг детектування рівним подвоєній амплітуді шумів. Рівень флуктуації шумів нульового сигналу визначається як відстань між граничними положеннями нульової лінії за певний час і при частоті флуктуацій не нижче 0,05 Гц.

Якщо через детектор пропускається лише потік рухомої фази, сила струму детектора на виході підсилювача буде постійною. Виникає так званий **фоновий струм** детектора. Знаючи фоновий струм, можна встановити присутність та оцінити кількість забруднень у детекторі, визначити випаровування нерухомої фази з колонки та забруднення потоку рухомої фази тощо.

Лінійна залежність сигналу детектора від кількості чи концентрації уведеної в нього речовини характеризує лінійність детектора. На лінійній ді-

лянці цієї залежності немає необхідності калібрувати детектор, якщо відомий її тангенс кута нахилу. У нелінійній частині робота з детектором недостатньо точна та надійна. Тому задають верхню точку використання детектора в лінійній частині залежності. Ця точка з відхиленням від лінійності не більше 3% визначається як верхній поріг лінійності детектора. Відношення верхнього порогу лінійності до порогу детектування називається лінійним динамічним діапазоном детектора (ЛДД).

Одним з основних показників детектора, що впливають на форму хроматографічної кривої є *інерційність детектора*. Інерційність детектора залежить від об'єму детектора, конструкції його вимірювальної камери та від властивостей чутливого елемента детектора. Інерційність детектора визначається постійною часу детектора, що виражається у секундах. Постійна часу детектора – це час з моменту попадання речовини в детектор до моменту, коли показання детектора досягнуть значення 0,632 від максимального значення сигналу. Ідеальний детектор повинен мати постійну часу, рівну нулю. Однак на практиці постійна часу детекторів зазвичай лежить у межах 10^{-3} -10 с.

Оскільки усі газохроматографічні детектори призначені для вимірювання деякого параметру (аналітичної властивості), що різниться для чистого газу-носія та суміші газу-носія з речовиною, що аналізується, то, по суті, потрібно здійснити кількісне вимірювання різниці цього параметру в умовах, коли відношення вмісту компонента, що аналізується, та матриці у бінарній суміші змінюється у межах від $1:10^3$ до $1:10^{12}$. Детектуючі системи класифікують за наступними ознаками:

1) детектори можуть бути універсальними (у), селективними (сл) та специфічними (сп);

2) за типом чутливості детектори діляться на потокові (п) та концентраційні (кц);

3) в залежності від аналітичної властивості, що використовується для детектування розрізняють детектори загальнофізичні (зф), іонізаційні (і), оптичні та спектральні (ос), електрохімічні (ех) та реакційні (р).

Позначення:

ДТП – детектор по теплопровідності (у, кц, зф);

ГВ – газові ваги (густиномір) (у, кц, зф);

УЗД – ультразвуковий детектор (у, кц, зф);

ДІП – детектор іонізації в полум'ї (у, п, і);

ДІПВА – детектор іонізації в полум'ї з водневою атмосферою (сл, п, і);

ФІД – фотоіонізаційний детектор (сл, п, і);

ТІД – термоіонний детектор (сл, п, і);

ГІД – гелієвий іонний детектор (сл, п, і);

ДЗЕ – детектор по захопленню електронів (сл, п/кц, і);

ПФД – полуменево-фотометричний детектор (сл, п, ос);

МС – мас-спектрометричний (у/сл, п, ос);

ІЧС – ІЧ-спектрометр (у/сл, кц, ос);

АЕС – атомно-емісійний спектрометр (сл/сп, п, ос)
ААС – атомно-адсорбційний спектрометр (сп, п, ос);
КМД – кулонометричний детектор (сл, кц, ех);
ЕДХ – електролітичний детектор Хола (сл, п, ех/р)
ХЛД – хемілюмінесцентний детектор (сл, п, р/ос).

Кожен детектор може бути віднесений до того чи іншого типу кожної з наведених вище класифікацій, деякі з них в залежності від умов можуть бути віднесені одразу до двох чи декількох типів, як, наприклад, ДЕЗ (потоківий/концентраційний) чи ХЛД (спектральний/реакційний) тощо.

До поточкових детекторів відносять ті детектори, сигнал яких пропорційний масі, що проходить через детектор в одиницю часу. Поріг детектування для поточкових детекторів також виражають в одиницях маси речовини, що поступає в детектор в одиницю часу, тобто в г/с.

Для концентраційних детекторів розмір проби виражається через її концентрацію в детекторі в максимумі піка. Детектор такого типу реагує на зміну концентрації аналізованого компонента в газово-носії в камері детектора, а не на масу компонента як такого. Це значить, що якщо склад суміші, яка проходить через детектор, не міняється, то детектор не виробляє ніякого сигналу. Поріг детектування для таких детекторів виражають в одиницях маси на одиницю об'єму, тобто в г/мл.

Універсальні детектори повинні детектувати будь-яку речовину, що виходить з колонки. Таких детекторів всього декілька. Майже всі вони базуються на вимірюванні об'ємних фізичних властивостей газової суміші, що виходить з колонки. Близькі до універсальних спектральні детектори, що детектують за мас-спектрами, ІЧ-спектрами тощо.

Селективні детектори при вимірюванні аналітичної властивості молекул аналізованої суміші проявляють селективність до тих молекул суміші, що мають цю властивість. Детектори можуть бути селективними по відношенню до хімічних елементів, молекул певної будови, тієї чи іншої функціональної групи чи певної властивості.

Специфічними називають селективні детектори, що відрізняються дуже високою селективністю. Специфічність, близьку до ідеальної, мають спектральні детектори високої роздільної здатності та реакційні детектори, у яких використовується специфічна реакційна здатність аналізованої сполуки.

Детектори, що базуються на вимірюванні фізичних властивостей газової суміші, реєструють зміну аналітичної властивості у присутності компонентів аналізованої проби в порівнянні з властивостями чистого газу-носія. Наприклад, вимірюється теплопровідність парової фази, при цьому теплопровідність чистого газу-носія приймають за “нульову лінію”, що відповідає нульовому вмісту аналізованого компонента. Як уже відмічалось вище, такі детектори мають типову концентраційну чутливість. Відносна зміна аналітичної властивості газової фази невелика, через те що в реальних умовах кон-

центрація аналіту у рухомій газовій фазі зазвичай дуже мала. Таким чином детектор завжди повинен вимірювати відносно слабкий сигнал на великому фоні. Зазвичай для цього застосовують компенсаційні (“мостові”) методи вимірювання, у яких аналітична властивість чистого газу-носія приймається за нуль. Абсолютні пороги детектування для таких детекторів мають досить високі значення.

Будь-який ефект, в результаті якого при зростанні концентрації молекул аналізованої сполуки в газові-носієві зростає його електропровідність, може бути використаний для детектування. За допомогою електрометричного підсилювача з високим входним опором, електричний заряд, що виникає, перетворюється в імпульс напруги та реєструється. Саме на різних методах іонізації базується більшість газохроматографічних детекторів. В їх число входить іонізація в полум’ї, фотоіонізація, різні термоіонізаційні методи, іонізація через збуджені атоми інертного газу та детектування за захопленням електронів. У всіх випадках для збудження іонізаційного струму використовуються різні явища, однак мета завжди одна і та ж: одержати струм, кількісно пов’язаний з властивостями елюату. Іонізаційні детектори можна розглядати як пристрої, що порівнюють властивості речовин, що виходять з колонки, з властивостями чистого газу-носія (рухомої фази), оскільки за відсутності аналізованих компонентів іонний струм рівний нулю чи дуже малий. Сигнали таких детекторів можуть бути підсилені електронними підсилювачами у більшому ступені, ніж сигнали детекторів, що працюють на принципі вимірювання фізичних властивостей газової суміші. Завдяки цьому пороги детектування іонізаційних детекторів значно нижчі, їх селективність змінюється у широких межах від практично універсального ДП до високоселективного ДЕЗ. Чутливість при детектуванні різних сполук також може дуже різнитися в залежності від механізму іонізації.

Застосування спектральних методів аналізу парової фази для газохроматографічного аналізу приваблює з цілого ряду причин. Велика різноманітність методів, які можуть бути застосовані, дозволяє очікувати, що вдасться досягти детектування, близького до універсального. Якщо детектування проводити в широких межах, то ця мета цілком досяжна. З іншого боку, використовуючи апаратуру з високою роздільною здатністю можна здійснювати специфічне детектування. Єдиним недоліком спектрального детектування є висока комерційна вартість більшості спектрометрів, що часом значно перевищує вартість самого газового хроматографа. Часто спектрометр виявляється набагато складнішим приладом. Окрім того, може виникнути проблема стикування цих двох приладів, пов’язана з кількісним переносом проби з хроматографа в спектрометр без погіршення розділення в процесі хроматографування. У наш час переваги сполучення газової хроматографії із спектроскопією реалізовані в ряді приладів, наприклад газова хроматографія – мас-спектрометрія (ГХ/МС), газова хроматографія – ІЧ-спектрометрія (ГХ/ІЧС) тощо. Кількісні характеристики цих та інших спектральних детекторів зале-

жать від робочого діапазону та методу детектування, а також, певна річ, від роздільної здатності хроматографічної колонки.

В числі детекторів, що контролюють газове середовище не безпосередньо, а побічно, перш за все слід назвати електрохімічні детектори. За їх використання в газохроматографічних системах компоненти, що виходять з колонки, спочатку переводять у розчин і тільки після цього детектуються. Оскільки тільки деякі органічні сполуки, для аналізу яких використовується ГРХ, проявляють електрохімічну активність (здатність окиснюватися чи відновлюватися в розчині) чи помітно змінюють електропровідність розчину. Тому для здійснення електрохімічного детектування аналіт потрібно попередньо піддати хімічному чи фізичному розкладу чи перетворенню. Усі ці проміжні процеси потрібно ретельно контролювати, в іншому разі результати аналізу можуть виявитися хибними. Електрохімічні детектори у наш час залишаються спеціалізованими приладами, що використовуються лише в особливих випадках.

Реакційні детектори – це детектори з вельми різними характеристиками, які відрізняються тим, що після виходу з хроматографічної колонки компоненти аналізованої проби попередньо піддають хімічному чи фізичному перетворенню у форму, придатну для детектування. До реакційних детекторів можна віднести електрохімічні детектори, які потребують попереднього перетворення детектованих компонентів. Сюди ж слід віднести детектуючі системи, у яких застосовуються реакції піролітичного чи термічного розкладу, а також системи з каталітичним перетворенням аналітів в сполуки, що детектуються звичайними детекторами, наприклад ДП. Такі детектори вельми селективні через високу специфічність каталітичних реакцій. Зазвичай вони мають не концентраційну а потокову чутливість.

Деякі із згаданих детекторів детальніше розглянуті нижче.

Детектор по теплопровідності (катарометр) (ДТП) – один із найпоширеніших детекторів. Принцип дії катарометра є наступним: кількість тепла, що нагріті тіла віддають оточуючому газовому середовищу, залежить від складу останнього. Тому знаючи, яку кількість тепла віддано, можна судити про склад газової суміші. На рис. 4.12 наведена схема чутливого елемента катарометра. В циліндричній порожнині металевого блоку 5 розташована металева спіраль 3. Через спіраль проходить постійний електричний струм, внаслідок чого вона нагрівається. Якщо спіраль омиває чистий газ-носіє, за постійної швидкості потоку спіраль втрачає постійну кількість тепла, і після досягнення рівноваги температура спіралі стає постійною. Однак, якщо склад газу міняється, наприклад при появі зони речовини, що хроматографується з колонки, температура спіралі також міняється, що викликає відповідну зміну електричного опору. Ця зміна вимірюється мостом Уїтстона. Зазвичай спіралі виготовляють з металів, що мають високий термічний коефіцієнт опору, стійких до хімічної корозії. Як правило, використовують вольфрам або платину, рідше нікель.

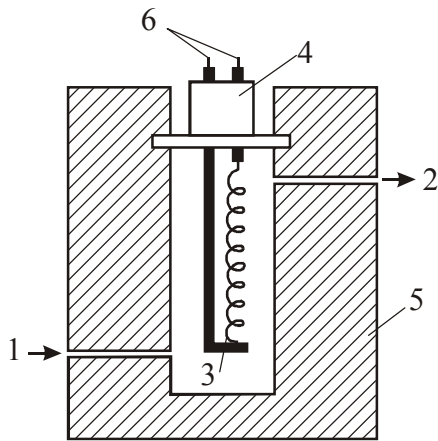


Рис. 4.12. Вимірювальна комірка ДТП: 1 – вхід газу-носія; 2 – вихід газу-носія; 3 – спіраль; 4 – керамічний ізолятор; 5 – металевий корпус; 6 – контакти.

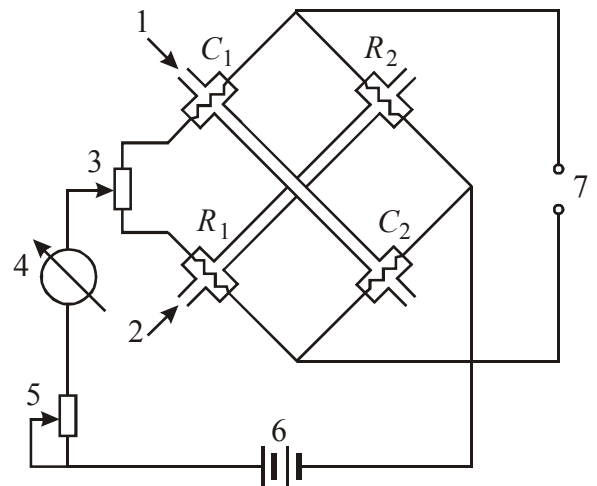


Рис. 4.13. Принципова схема підключення катарометра: 1 – вхід газу-носія з колонки; 2 – вхід чистого газу-носія; 3 – потенціометр; 4 – мікроамперметр; 5 – регулятор сили струму; 6 – джерело живлення; 7 – клема самописця.

Зміна опору чутливого елемента катарометра вимірюється і перетворюється у вихідний сигнал. На рис. 4.13 наведене просте підключення мосту Уїтстона. Якщо у всіх чотирьох чутливих елементів, C_1 , C_2 , R_1 та R_2 однакова температура і, отже, однаковий опір, то міст знаходиться у рівновазі. Однак, коли опір чутливих елементів C_1 та C_2 міняється через зміну складу газу, що проходить через них, рівновага порушується і генерується вихідний сигнал. Більшість детекторів мають дві пари однакових чутливих елементів. Порівняльний потік газу-носія омиває чутливі елементи R_1 та R_2 , тоді як газ, що поступає з колонки, омиває чутливі елементи C_1 та C_2 . Таке обладнання катарометра збільшує інтенсивність сигналу та покращує стабільність мосту по відношенню до змін температури середовища. Усі чотири чутливих елементи скомпоновані в один металевий (бронзовий чи латунний) блок з високою теплоємністю. Для забезпечення стабільності роботи детектора він термостатується. У хроматограф, що працює в ізотермічному режимі, катарометр поміщають у термостат колонок, у хроматограф, що передбачає програмування температури, катарометр термостатується окремо (у термостаті детекторів), причому його температуру вибирають таким чином, щоб вона була не меншою, ніж максимальна робоча температура в термостаті колонок. Потрібно однак враховувати, що з підвищенням температури в термостаті детекторів зменшується різниця в температурах спіралі і стінок комірки, що приводить до падіння чутливості катарометра. Застосування газу-носія з більшою теплопровідністю, наприклад, гелію, дозволяє збільшити коливання теплопровідності газової суміші після колонки і, отже, сприяє значному підвищенню чутливості детектора теплопровідності. Іншим фактором збільшення чутливості детектора є збільшення струму мосту, що викликає різке підсилення вихідного сигналу. Однак надмірне збільшення струму викликає нестабільність нульової лінії і навіть згорання металевої спіралі. Поріг детектування за

пропаном при використанні гелію як газу-носія не перевищує $2 \cdot 10^{-8}$ г/мл. Лінійний динамічний діапазон детектора складає 10^4 .

Детектор іонізації в полум'ї (ДІП) - найбільш часто застосовуваний детектор, що так само універсальний, як і катарометр, але має набагато більшу чутливість.

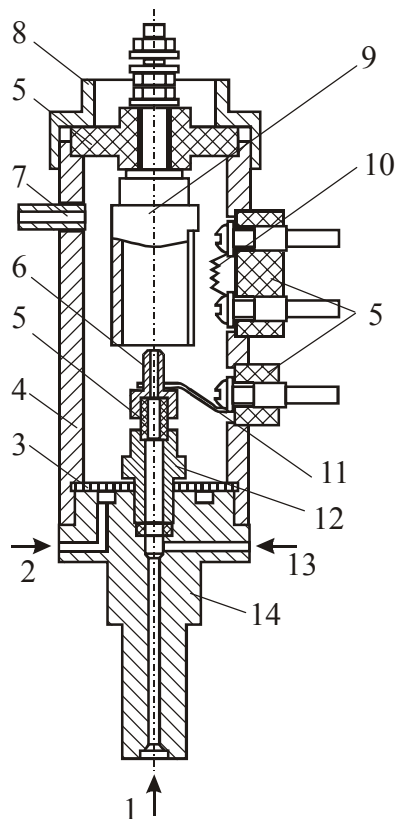


Рис. 4.14. Детектор іонізації в полум'ї: 1 – вхід газу носія від колонки; 2 – вхід повітря; 3 – сітка; 4 – корпус; 5 – керамічний ізолятор; 6 – наконечник пальника; 7 – вивід газів; 8 – кришка; 9 – колекторний електрод; 10 – спіраль; 11 – пружний контакт; 12 – нижня частина пальника; 13 – вхід водню; 14 – основа.

На наконечник пальника 6 через пружний контакт 11, ізолюваний керамічною вставкою 5 від корпусу, подається напруга. Спіраль 10, напруга на яку подається контактами, ізолюваними від корпусу керамічною вставкою, служить для запалювання полум'я. У верхній частині детектора розташований вивід газів 7. У кришку 8 детектора через керамічний ізолятор 5 вмонтований колекторний електрод 9, виконаний у вигляді циліндра з прорізом для запалювання полум'я.

Водень і повітря (кисень) подаються на ДІП із блоку підготовки газів з певною постійною об'ємною витратою. Якість роботи детектора залежить від підходящого вибору витрати усіх газових потоків, що використовуються детектором. Зазвичай найкраща чутливість та стабільність детектора досягаються за швидкості потоку газу-носія 30-50 мл/хв, водню приблизно 30 мл/хв

Дія детектора ґрунтується на іонізації органічних речовин у полум'ї водню і вимірюванні величини іонного струму, що утворюється під впливом напруги, прикладеної до електродів детектора.

Оскільки чисте водневе полум'я (плазма) практично не містить іонів, іонний струм детектора прямо пропорційний кількості органічної речовини, що надходить у полум'я в одиницю часу. Його використовують для кількісних розрахунків результатів хроматографічного аналізу.

Сам детектор (рис. 4.14) виконаний у вигляді циліндричної камери, що складається з основи 14, корпусу 4 і кришки 8. У нижній частині камери розташований пальник, наконечник 6 якого ізолюваний від нижньої частини 12 керамічною трубкою 5. Через отвори в основі детектора до пальника підводиться газ-носії 1 із колонки і водень 13. По іншому патрубку 2 у нижню частину камери підводиться повітря або кисень.

та повітря 300-500 мл/хв. Якщо замість повітря використовується кисень, то швидкість його подачі зменшують у 4-5 разів, однак необхідно відмітити, що на кисневі детектор працює менш стабільно. Живлення детектора здійснюється від блоку живлення детекторів 7 (див. рис. 4.9). Детектори іонізації в полум'ї встановлюють на кришці термостату колонок. Для зменшення коливань нульової лінії, наприклад при програмуванні температури два ДПи можуть працювати в диференційному режимі, коли напруга на електродах у них зворотна і сигнали взаємно вираховуються. Поріг детектування за пропаном - $3 \cdot 10^{-12}$ г/с. Лінійний динамічний діапазон детектора складає 10^6 - 10^7 .

Детектор густини газів (газові ваги) (ГВ) застосовується рідше через невисоку чутливість.

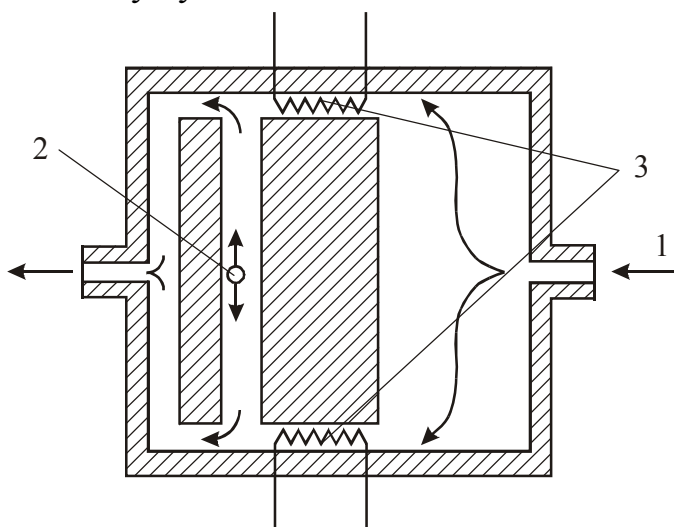


Рис. 4.15. Спрощена схема роботи детектора густини газів: 1 – вхід чистого газу-носія; 2 – вхід газу-носія від колонки; 3 – чутливі елементи.

Вимірювальна комірка (рис. 4.15) улаштована таким чином, що чистий газ-носії 1, входячи в першу камеру, розподіляється на два рівних потоки, що ведуть у другу камеру. Газ, що виходить із колонки, потрапляє з отвору 2 у другу камеру. Якщо його густина більше, ніж у чистого газу-носія, то він опускається вниз, де збільшує опір нижньому потокові з першої камери. Різниця у швидкостях витікання з першої камери верхнім каналом і нижнім вимірюється чутливими елементами 3, як у детекторі по теплопровід-

ності. Незважаючи на меншу чутливість, детектор має ту перевагу, що з його допомогою можна визначати молекулярну масу аналіту і проводити кількісний аналіз суміші без попереднього калібрування. Поріг детектування - $1 \cdot 10^{-7}$ г/мл за пропаном при використанні азоту як газу-носія. Лінійний динамічний діапазон детектора складає 10^3 .

Детектор по захопленню електронів (ДЗЕ) має найбільшу чутливість та селективність з усіх іонізаційних детекторів. За останні роки конструкцію ДЗЕ вдалося спростити та зробити його досить зручним у роботі, тому у наш час його можна рахувати загальнозживаним детектором.

ДЗЕ був розроблений Ловлоком на базі аргонного іонізаційного детектора. У цьому детекторі до електродної пари, що розміщується у потоці аргону, прикладалася напруга близько 1000 В. Під дією електронів, що вилітали з радіоактивного джерела, атоми аргону переходили у метастабільний стан (з енергією 11,6 еВ) та при зіткненнях іонізували молекули багатьох сполук за реакцією:

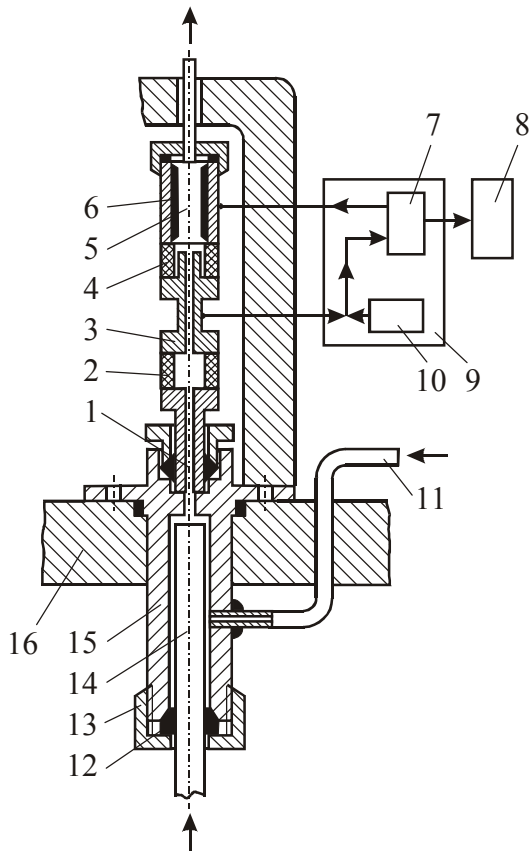
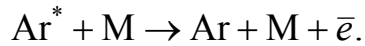
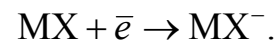


Рис. 4.16. Детектор по захопленню електронів: 1 – з'єднувальний канал; 2, 4 – керамічні ізолятори; 3 – електрод; 5 – іонізаційна камера; 6 – радіоактивне джерело; 7 – джерело імпульсів змінної частоти; 8 – електрометричний підсилювач; 9 – блок живлення ДЗЕ; 10 – джерело частоти порівняння; 11 – патрубок для додаткового газу; 12 – ущільнювач; 13 – накидна гайка; 14 – колонка; 15 – основа; 16 – нагріта плита.

Зазвичай в ДЗЕ газ-носіє рухається назустріч негативно зарядженим часточкам. Оскільки швидкість дрейфу вільних електронів значно більша лінійної швидкості газу-носія, на ефективність збирання вільних електронів потік газу-носія практично не впливає.

У ДЗЕ були випробувані різні джерела первинних електронів, у тому числі тритій і нікель-63, які є джерелами м'якого β -випромінювання. Гарні результати були отримані також з деякими нерадіоактивними джерелами електронів. Чутливість ДЗЕ залежить від швидкості захоплення електронів, швидкості рекомбінації електронів та позитивно заряджених іонів, концентрації аналіту та вихідної частоти. Головним недоліком ДЗЕ є обмежений лінійний динамічний діапазон, котрий нерідко не перевищує двох порядків. За-

У ДЗЕ аргон був замінений на суміш аргону з 5-10% метану (для придушення процесу утворення метастабільних атомів) чи на азот, (у якому такі атоми взагалі не утворюються). Основна перевага такого детектора полягає в тому, що первинний β -електрон генерує до 10000 вторинних електронів. Повільні електрони, що утворилися, рухаються до аноду під дією прикладеної напруги. Збираючись на аноді, електрони дають струм, який підсилюється електрометром. При попаданні в детектор аналіту вільні електрони захоплюються ним з утворенням негативно заряджених іонів:



Вірогідність захоплення дуже велика, і ефективність іонізації наближається до 100% для газів та парів, що сильно захоплюють електрони.

Таким чином, введення молекул, здатних захоплювати електрони, призводить до втрати останніх, що обумовлює зменшення іонізаційного струму в камері в залежності від концентрації аналіту.

стосування детектора в режимі постійного струму детектора з автоматичним управлінням частотою анодних імпульсів дозволяє розширити ЛДД до 10^4 .

Конструкція та схема живлення ДЗЕ, що базується на імпульсному методі, наведена на рис. 4.16. У цій моделі детектор безпосередньо увімкнений в електронну схему зворотного зв'язку. На іонізаційну камеру 5 з радіоактивним джерелом 6 подаються від'ємні імпульси напруги від регульованого генератора частоти. Вільні електрони, що утворилися в камері ДЗЕ з чистим газом-носієм, рухаються до колекторного електроду 3 назустріч потоку газу-носія та, збираючись на колекторі, дають іонізаційний струм. Частота імпульсів встановлюється електронною схемою так, щоб іонізаційний струм був рівний струмові порівняння, який має постійне значення і подається від джерела струму порівняння 10 блоку живлення 9. Вихідний сигнал електронметричного підсилювача 8 являє собою напругу, пропорційну частоті імпульсів, а різниця частот пропорційна концентрації проби в детекторі.

За температури детектора 250°C поріг детектування досягає 10^{-13} г ліндану на 1 мл газу-носія (азоту). Сполуки з сильно вираженою тенденцією до захоплення електронів детектуються з надзвичайною чутливістю. Так для гексафториду сірки ПД складає 10^{-14} г/с, а для N,N-дипентафторобензоїлпентафтороаніліну – навіть $9 \cdot 10^{-17}$ г/с. Якщо прийняти чутливість ДЗЕ до хлорбензолу за одиницю, то для *n*-гексану ця величина буде рівна 0,01, для нафталіну – 0,1, для ацетофенону – 10, для бензоїлхлориду – близько 100, для хлороформу – близько 1000 та для чотирьоххлористого вуглецю – приблизно 10000.

Термоіонний детектор (ТІД) називають також азотно-фосфорним детектором, оскільки він селективний до цих елементів. За конструкцією ТІД подібний до детектора іонізації в полум'ї. Особливість цього детектора полягає в тому, що поблизу водневого полум'я вміщують сіль лужного металу, тобто роль поляризуючого електроду виконує кільце, встановлене безпосередньо над пальником. Нагріта сіль лужного металу (частіше за все це бромід цезію чи рубідію) атомізується, атоми лужного металу, що утворюються при цьому, дисоціюють на іони та електрони, які піддаються впливу електричного поля. У присутності сполук, що містять галоген, азот чи фосфор, фоновий іонний струм зростає. Отриманий сигнал пропорційний кількості іонів, що утворилися. Теорія цього процесу до кінця не розроблена, однак вважається, що основну роль в ньому відіграє термічна іонізація, причому основні процеси відбуваються в полум'ї, а сіль слугує лише джерелом атомів лужного металу. Недоліками роботи таких ТІД є сильна залежність основних характеристик детектора від витрати газів, труднощі з заміною сольового резервуару, швидке виснаження запасів пари солі лужного металу і, відповідно, низький час безперервної роботи детектора без зміни його робочих характеристик, забруднення солі продуктами згорання аналітів, що призводить до нестабільності роботи детектора.

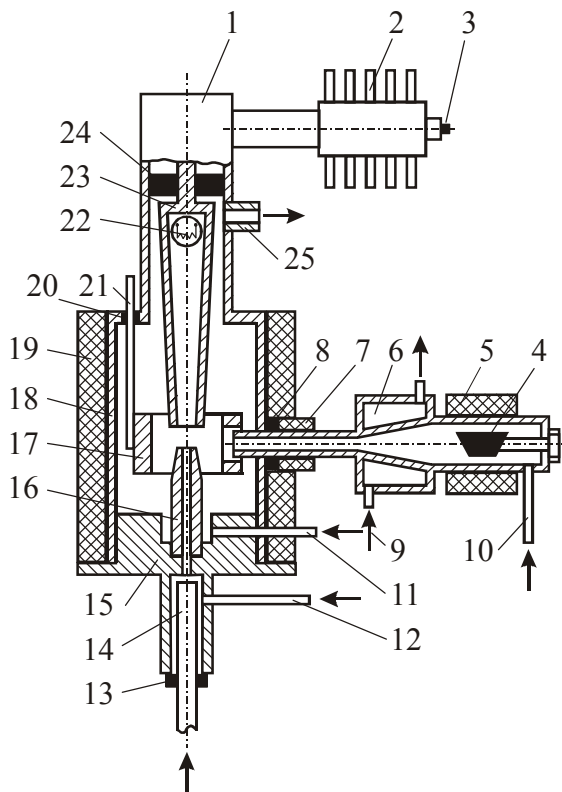


Рис. 4.17. Термоіонний детектор з генератором аерозолу: 1 – кришка; 2 – радіатор; 3 – коаксіал до електрометра; 4 – ложка із сіллю; 5 – нагрівач; 6 – водяний холодильник; 7 – ущільнююча гайка; 8 – ущільнювач; 9 – вхід води; 10 – вхід інертного газу; 11 – вхід повітря; 12 – вхід водню; 13 – ущільнювач; 14 – колонка; 15 – основа; 16 – пальник; 17 – потенціальний електрод; 18 – корпус; 19 – нагрівач; 20 – ізолятор; 21 – вхід потенціального електроду; 22 – спіраль запалювання; 23 – колекторний електрод; 24 – вихід газів; 25 – ізолятор.

Температура нагріву солі $500 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Пара, що утворилася, потоком інертного газу виноситься в холодильник, де охолоджується, переходить в стан перенасичення, а потім в аерозоль. Монодисперсність аерозолу досягається шляхом його розведення великою кількістю інертного газу. Аерозольні часточки солі поступають в гарячу зону детектора всередину потенціального електроду. Подача солі у вигляді аерозолу забезпечує стабільний потік лужного металу.

Детектор може працювати більше 2000 годин без заміни резервуару з сіллю за постійної чутливості й сили фонового струму. Маса солі в держаку близько 1 г. Перед тим, як помістити сіль в генератор, її нагрівають 20-30 годин за 400°C для видалення летких забруднень, що збільшують рівень шуму та дрейф нульової лінії. Такий детектор практично позбавлений недоліків, що характерні для звичайних ТІД.

Для усунення перерахованих вище недоліків була запропонована нова конструкція більш стабільного ТІД, у якій робоча камера детектора відокремлена від камери, де утворюється пара солі лужного металу, тобто до звичайного ТІД приєднаний генератор аерозолу солі лужного металу (рис. 4.17). Генератор аерозолу складається з трьох частин: термостатованої камери для випаровування солі лужного металу з кварцового держака (ложки) 4 в потоці інертного газу (азот), необхідного для транспортування пари солі в полум'я детектора; водяного холодильника 6, для перетворення пари солі в монодисперсні аерозольні часточки та конусного сопла для локального ведення аерозолу в зону полум'я. На потенційний електрод 17 детектора подається позитивна напруга 100-300 В; пальник 16 і негативний електрод джерела живлення заземлені. Сигнал з колекторного електроду 23 подається на вхід електрометричного підсилювача та реєструється потенціометром (самописцем). Джерелом пари лужного металу слугує сіль CsBr.

Чутливість ТІД до різних гетероатомів змінюється в широких межах. Окрім того, вона дещо залежить від наявних у сполучі функціональних груп. В основному ТІД використовується для детектування азот- та фосфорвмісних органічних сполук. ПД по азоту серійних ТІД досягає $(1-4) \cdot 10^{-13}$ г/с (азобензол), по фосфору – $(1-4) \cdot 10^{-14}$ г/с (паратіон). Селективність до азоту в порівнянні з вуглецем (в октадекані) досягає $4 \cdot 10^4$, а до фосфору - $8 \cdot 10^4$. Лінійний динамічний діапазон детектора не менше 10^4 .

Блоки забезпечення роботи детектора. Всі детектори вимагають відповідного живлення, що здійснюється спеціалізованим блоком живлення іонізаційних детекторів або блоком живлення катарометра і газових ваг. Останні два детектори вимагають термостатування, що не може бути здійснене в термостаті колонок, які працюють у режимі програмування температури. Тому катарометр і газові ваги розташовують у термостаті детекторів, де задана температура від $+50$ до $+400^\circ\text{C}$ підтримується з точністю $\pm 0,2^\circ\text{C}$.

Система опрацювання сигналу і реєстрації хроматограм. Електрометр або вимірювач малих струмів призначений для посилення сигналу детектора до розміру, що забезпечує його точний вимір і реєстрацію за допомогою самописця. Необхідною вимогою до електрометра є висока чутливість і широкий діапазон вимірів, а також малі власні шуми. Вимірювач малих струмів, застосовуваний у хроматографах серії “Цвет” (Росія), призначений для виміру струмів від $2 \cdot 10^{-12}$ до $2 \cdot 10^{-6}$ А на 18 межах вимірювання.

Самописець призначений для реєстрації сигналу від підсилювача на рухомій діаграмній стрічці. Передбачено можливість зміни швидкості руху стрічки. Одна з вимог до самописця - можливо менша інерційність, тобто велика швидкість руху пера самописця від одного кінця шкали до іншого (не більше 1 с).

Інтегратор призначений для виміру площі піків у координатах час - значення струму (мА). Результат обчислень (час утримування компонента та площа піка) може виводитися на табло цифрових індикаторів, роздруковуватися на стрічці або зображуватися графічно за допомогою самописця (інтегральна хроматограма). Варто врахувати, що уширення і втрата симетричності піків знижують точність обчислень інтегратора.

4.3.2. Вплив параметрів хроматографічного процесу на розділення

Газ-носії. Природа газу-носія не впливає на коефіцієнт Генрі, а тому не позначається на селективності у ГРХ. Невелика відмінність буде визначатися різницею в густині та здатності газів стискатися, що впливає на градієнт тиску в колонці.

В'язкість газу-носія повинна бути як можна меншою для підтримки невеликого перепаду тиску у колонці.

Газ-носії повинен поглинатися сорбентом суттєво гірше, ніж будь-який з аналітів, оскільки тільки в цьому випадку виконуються умови елюційного аналізу.

Швидкість рухомої фази у хроматографії визначає ВЕТТ. За низьких швидкостей газу-носія ефективність роботи колонки (рис. 3.6) буде визначатися вихровою дифузією A і поздовжньою дифузією B , а при високих швидкостях - вихровою дифузією A і дифузією масопередачі C .

Оптимальне значення швидкості газу-носія встановлюється емпірично або підбирається дослідним шляхом для кожній колонки.

Нерухома рідка фаза. Характер фази вибирається відповідно до емпіричного правила: подібне в подібному, тобто для розділення неполярних речовин застосовують неполярні фази, для полярних – полярні фази. Враховуються рекомендації довідників і літературні дані по розділенню аналогічних сполук. Залежність ефективності розділення від кількості нерухомої рідкої фази має такий же характер, як і від швидкості газу-носія, тобто якщо фази дуже мало, не забезпечується максимальна поверхня масообміну, а якщо дуже багато – збільшується дифузія масообміну. Застосування колонок із більшим, ніж оптимальне, вмістом нерухомої фази виправдано в тих випадках, коли доцільно працювати при підвищених температурах (що компенсують збільшення часу хроматографування).

Розмір проби. Мінімальний розмір проби визначається чутливістю детектора і сумою “шумів” хроматографа, що приводять до тремтіння нульової лінії. Максимальний об’єм проби визначається “насиченням” колонки, що сильно уширює піки головних компонентів. Практично для набивних колонок уводять пробу 0,1-10 мкл 10-20% розчину суміші у підходящому леткому розчиннику. Для капілярних колонок користуються тим же шприцом, але перед колонкою ставлять дільник потоку, що зменшує розмір проби ще в 10-100 разів.

Температура випаровувача, якщо вона недостатня, призводить до уповільнення випаровування важко летких компонентів і внаслідок цього до появи “хвостів” у піків. За високих температур у випаровувачі речовини з низькою термостабільністю можуть розкладатися. Зазвичай температуру випаровувача вибирають на 20–30°C вище, чим максимальна температура в термостаті колонок, однак вона не повинна бути дуже високою, оскільки продукти розкладу можуть викликати прогресивне погіршення відтворюваності та правильності аналізу.

Температура в термостаті колонок є основним чинником в ГРХ, що змінюється. Підвищення температури скорочує час аналізу, але зменшує селективність розділення (прямі залежностей величини відносного об’єму утримування від температури при збільшенні останньої зазвичай зближуються). При зниженні температури крім збільшення часу утримування спостерігається уширення хроматографічних піків і зменшення їхньої висоти, що рів-

нозначно падінню чутливості. Таким чином, для пари речовин із близькими коефіцієнтами розподілу на даній колонці існує оптимальний інтервал температур, за якого при порівняно короткому часі аналізу і достатній чутливості спостерігається високий коефіцієнт селективності. Для багатокомпонентних сумішей не завжди вдається підібрати *ізотермічний режим*, що підходить для селективного розділення всіх компонентів. У такому випадку хроматографію ведуть у режимі програмування температури. Програмування температури чи контрольована зміна температури колонки в процесі аналізу використовується для поліпшення, спрощення та прискорення розділення та ідентифікації компонентів суміші. Цей метод дуже зручний в аналізі складних сумішей, які містять сполуки з найрізноманітнішими температурами кипіння. На рис. 4.18 порівнюються хроматограми однієї і тієї ж суміші алкіладамантанів, одержані на одній і тій же колонці за ізотермічного розділення та розділення з програмуванням температури.

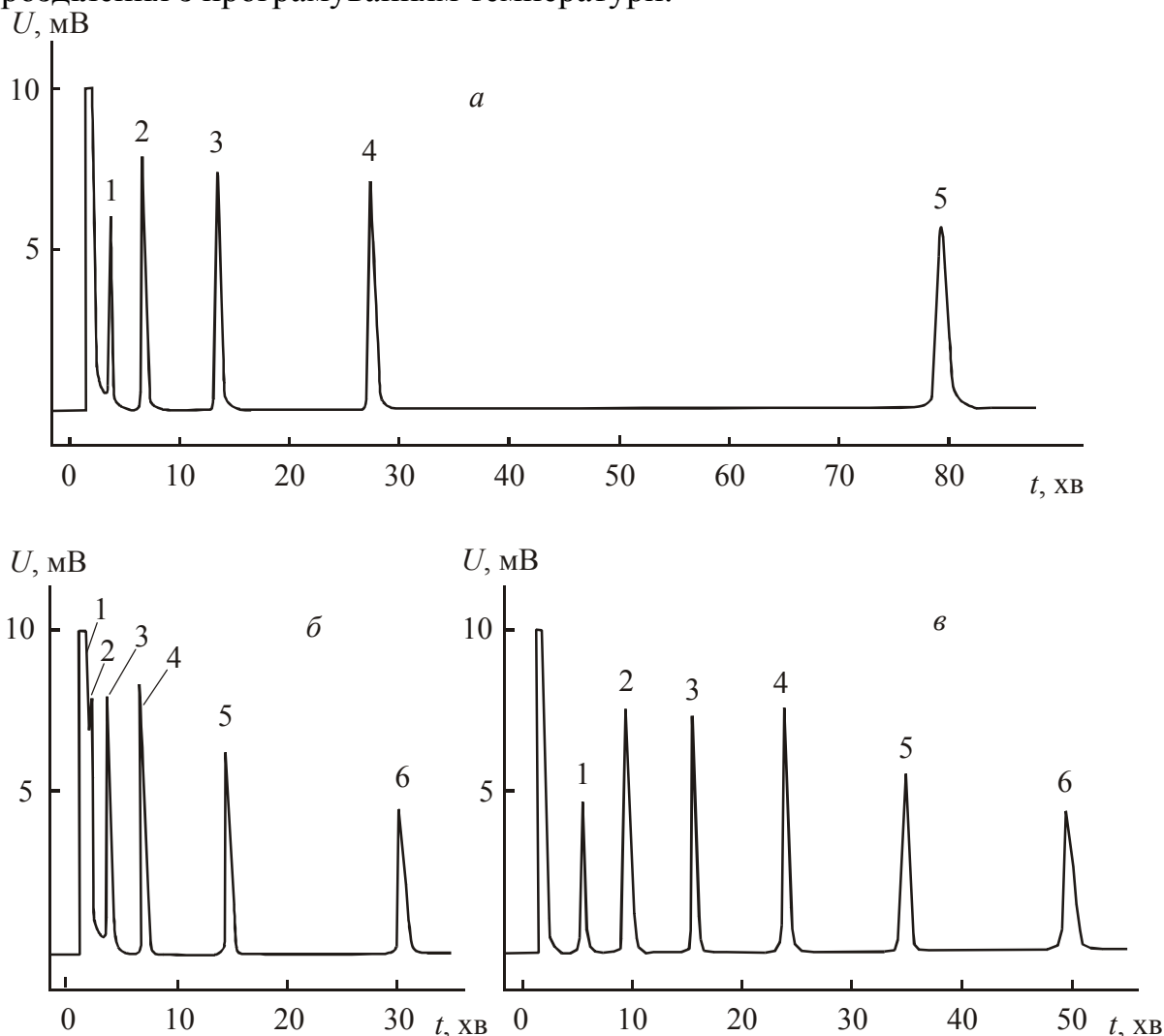


Рис. 4.18. Хроматограми суміші алкіладамантанів в ізотермічному режимі (а – 120°C, б – 250°C) та в режимі програмування температури (в – 100-250°C, 5 град/хв): 1 – 1-метиладамантан; 2 – 1-етиладамантан; 3 – 1-метил-3-етиладамантан; 4 – 1,3-діетиладамантан; 5 – 1-метил-3,5-діетиладамантан; 6 – 1,3,4-триетиладамантан.

За ізотермічного режиму хроматографування (рис. 4.18, *а*) аналіти з низькими температурами кипіння дають вузькі піки, в той час як піки висококиплячих аналітів розмиті, в ряді випадків їх площі взагалі неможливо обчислити. Підвищення температури збільшує ефективність розділення висококиплячих аналітів, однак за рахунок селективності розділення низькокиплячих (рис. 4.18, *б*). Програмуючи температуру, розділення можна спочатку вести за низьких температур, з тим щоб низькокиплячі аналіти добре розділялися, а потім підняти температуру в колонці. У цьому випадку висококиплячі компоненти також хроматографуються у вигляді вузьких піків і тривалість аналізу скорочується (рис. 4.18, *в*). Програмування температури застосовують переважно для аналізу сумішей компонентів з інтервалом температур кипіння 100°C і вище.

4.3.3. Застосування газорідної хроматографії

Якісний аналіз сумішей. На сьогоденному рівні розвитку ГРХ основний наголос робиться на якісне визначення та розділення компонентів. Все частіше ідентифікація сполук, що ґрунтується на характеристиках утримування, виявляється хибною і недостатньою, особливо у дослідницьких роботах. Основним напрямком розвитку сучасної хроматографії є не аналіз тих відносно простих сумішей (головним чином вуглеводнів), з яких власне починалася ГРХ, а дослідження складних сумішей природних сполук та біологічних матеріалів. Виділені стандартні сполуки у таких випадках відсутні, а більша частина компонентів суміші, що аналізується, майже завжди невідома. Тому не виключене перекривання чи неправильна ідентифікація піків деяких компонентів. Саме тому в наш час велику увагу приділяють розробці селективних детекторів а хроматографічний аналіз доповнюють спектрометричним аналізом, головним чином мас-спектрометрією. Тим не менше ідентифікація аналітів за характеристиками утримування (час утримування, об'єм утримування, відносний об'єм утримування, індекси утримування тощо) застосовується досить часто, оскільки цей метод дуже простий і не потребує складного хімічного обладнання.

Хроматограма дозволяє отримати три основних параметри: інтервал утримування (час чи об'єм), ширину (мм, мл об'єму газу-носія, час) і висоту піка. Спосіб ідентифікації за шириною піка не знайшов широкого використання. Ширина піка залежить не тільки від адсорбційних процесів, що мають місце у колонці, але й від дифузійних процесів, на які в значній мірі впливають експериментальні умови, через що ідентифікація за шириною піка надзвичайно важка. Необхідно також відмітити, що без попередньої, по меншій мірі орієнтовної, інформації про суміш, що аналізується, ідентифікація за характеристиками утримування практично неможлива, і навіть у найкращих випадках результати такої ідентифікації вельми непевні. Теоретично можна

порівнювати опубліковані дані по утримуванню з параметрами утримування, одержаними експериментально. Однак наведені в літературі дані можуть відрізнятися від одержаних експериментально навіть при повному відтворенні умов хроматографування, наведених у літературі. Неможливо гарантувати достатню ідентичність основних експериментальних умов, наприклад, якість твердого носія (часто навіть дві партії одного і того самого матеріалу однієї фірми-виробника можуть значно відрізнятися), температура термостату, вплив нерухомої фази, газу-носія тощо. Найчастіше проводиться просте порівняння питомого об'єму утримування аналіту з об'ємом утримування стандартної сполуки. Якщо вказані об'єми утримування співпадають в межах помилки експерименту, то вважають, що стандарт та аналіт ідентичні. Окрім того практикують додавання в аналізовану суміш зразок порівнювальної речовини, щоб спостерігати збільшення інтенсивності піка, який цікавить, чи появу нового піка. Збільшення інтенсивності одного з піків хроматограми може свідчити про ідентичність порівнювальної речовини та одного з компонентів суміші.

Через те, що на абсолютні значення об'ємів утримування (часів утримування) можуть впливати умови експерименту, уникнути помилок в ідентифікації за абсолютними характеристиками утримування важко, а в деяких випадках взагалі неможливо. Вплив експериментальних помилок на результати хроматографування можна значно знизити, замінивши абсолютні величини характеристик утримування на відносні:

$$r_{i,s} = V_{Ri}/V_{Rs} = V_{xi}/V_{xs} = (t_{Ri} - t_0)/(t_{Rs} - t_0), \quad (4.3)$$

де індексами i та s позначені аналіт та стандарт відповідно. Стандарт обирають таким чином, щоб його характеристики утримування лежали між характеристиками утримування аналітів. Це необхідно як для більш точного вимірювання характеристик утримування, так і з адсорбційних вимог (пік стандартної сполуки повинен бути симетричним). Тому очевидно, що спроби знайти універсальну стандартну сполуку не увінчалися успіхом. На колонках з твердим носієм суттєво різної полярності характеристики утримування такої сполуки будуть дуже різнитися, тому результати визначення будуть незадовільними.

Труднощі, що виникають через використання для ідентифікації відносних характеристик утримування, в значній мірі були переборені Ковачем, який увів індекси утримування. Система індексів утримування ґрунтується на виразі характеристик утримування за допомогою шкали характеристик утримування нормальних парафінів, яка дає стократне збільшення на один атом вуглецю в молекулі. Індекси утримування розраховуються з об'ємів утримування (чи інших характеристик) аналіту та по меншій мірі двох n -парафінів, що киплять в тій же області. Чистий утримуваний об'єм визначається виразом:

$$I = 100 \left[z + n (\lg V_{R(i)} - \lg V_{R(z)}) / (\lg V_{R(z+n)} - \lg V_{R(z)}) \right] \quad (4.4)$$

або

$$I = 100 \left[z + n (\lg r_{i,z} / \lg r_{(z+n),z}) \right] \quad (4.5)$$

де z – число атомів вуглецю в останньому парафіні, що хроматографується перед аналітом i , а $z+n$ – число атомів вуглецю в першому парафіні, що хроматографується після речовини i . Графічний метод розрахунку показаний на рис. 4.19.

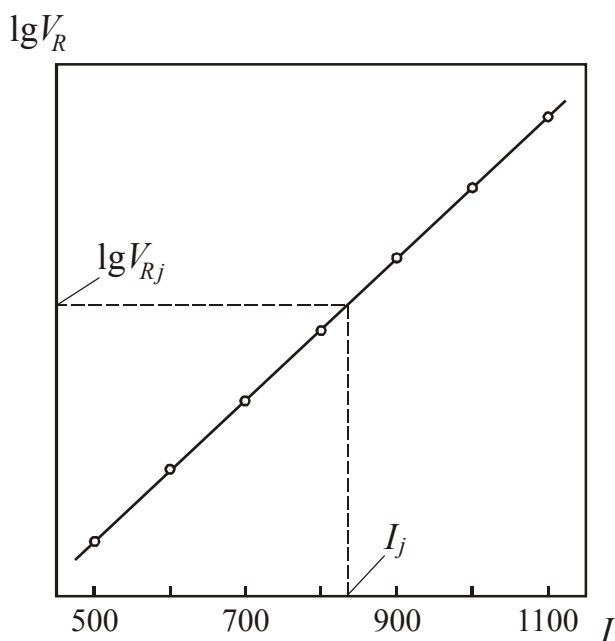


Рис. 4.19. Приклад використання індексів утримування: I – індекс утримування; V_R – об’єм утримування; j – компонент, що аналізується. Точки на прямій відповідають n -парафінам C_5 – C_{11} .

З рівнянь (4.4) та (4.5) очевидно, що чистий утримуваний об’єм можна замінити на будь-які характеристики утримування, наприклад час утримування чи інтервал утримування на хроматограмі. Оскільки (див. рис. 4.19) залежність $\lg V_R$ від числа атомів вуглецю в молекулі парафіну лінійна (зазвичай ця залежність добре виконується для всіх членів гомологічного ряду, окрім перших), рівняння (4.4) можна записати як:

$$I = 100z + 100/bz (\lg V_{R(i)} - \lg V_{R(z)}), \quad (4.6)$$

де $b = (\lg V_{R(z+n)} - \lg V_{R(z)})/n$, I – лінійна функція температури колонки в мінус першому ступені, що вказується залежністю $\partial I/\partial T$. Наприклад, символ $\partial I_i^{\text{аніезон L}} = 3,7$ значить, що індекс утримування сполуки i на колонці з нерухомою рідкою фазою апіезоном L змінюється на 3,7 одиниці при зміні температури на 10°C . Символ ∂I також використовується для позначення різни-

ці індексів утримування двох сполук на одній нерухомій фазі. Різницю індексів утримування сполук, що хроматографуються за однакової температури, але на різних нерухомих фазах, позначають як ΔI .

Ковач та інші дослідники вивели декілька важливих правил. Не всі ці правила підкріплені розрахунками, тим не менше вони корисні і при підборі хроматографічних умов, і при ідентифікації аналітів.

1. Для вищих членів гомологічного ряду індекси утримування збільшуються на 100, з додаванням у молекулу кожної нової CH_2 -групи. В ряді випадків, особливо для сильнополярних систем, спостерігаються відхилення від цього правила.
2. Для неполярної нерухомої фази різницю індексів утримування двох ізомерів можна оцінити за співвідношенням $\partial I \approx \partial T_k$, де T_k – температура кипіння. Однак це співвідношення часто не виконується.
3. Індокси утримування асиметрично заміщених сполук можна розрахувати з індексів утримування симетрично заміщених сполук.
4. Однакове заміщення в молекулах однакової структури приводить до однакового збільшення індексів утримування.
5. Індокси утримування неполярних сполук залишаються постійними незалежно від полярності нерухомої фази.
6. Якщо ΔI визначалася на двох нерухомих фазах різної полярності, то різниця між величинами ΔI є характеристичною величиною, що залежить від молекулярної структури, і її можна розрахувати шляхом додавання вкладів ΔI окремих груп у молекулі. Таким чином можна ідентифікувати невідомі компоненти на хроматограмі.

В деяких випадках важко, а часом навіть неможливо, особливо при використанні сильнополярної нерухомої фази, використовувати для порівняння гомологічний ряд нормальних парафінів. Тому ряд дослідників рекомендує інші гомологічні ряди. Використовуючи метиленову групу як основний інкремент гомологічного ряду, можна отримати рівняння, що дозволяють розрахувати індекси утримування шляхом порівняння різних гомологічних рядів.

$$I_{b(i)} = I_{a(i)} - I_{a(b)} + 100z(x), \quad (4.7)$$

де $I_{b(i)}$ – індекс утримування на основі гомологічного ряду b для речовини i тощо, а z – число атомів вуглецю в молекулі. Індокси утримування широко використовуються як для розрахунку даних утримування, так і з метою ідентифікації. Висока інформативність (наприклад, індекс $I=526$ показує, що в даній хроматографічній системі сполука хроматографується десь після n -пентану, але ближче до нього, ніж до n -гексану), проста залежність від тем-

ператури й адитивний характер парціальних індексів як функцій молекулярної будови – все це сприяє їх широкому використанню.

Кількісний аналіз сумішей. Перш ніж перейти до розгляду методів кількісного хроматографічного аналізу, необхідно відмітити можливі джерела помилок.

1. *Введення зразка.* У будь-якому методі кількісного аналізу проба, відібрана для аналізу повинна бути аліквотною, тобто не відрізнятися за своїм складом від решти маси матеріалу, що аналізується. Тому відбирати її необхідно надзвичайно ретельно. Велике значення має методика введення зразка. Зразок можна вводити у хроматограф у незміненому стані, можна попередньо його випарувати, чи розкласти, чи ж перевести у те чи інше похідне. Невірно вибрана методика приведе до хибних результатів.

2. *Адсорбція чи розклад зразка у хроматографі.* Кількісна газова хроматографія вимагає, щоб весь уведений в колонку зразок вийшов з неї у вигляді ряду піків, що відповідають компонентам зразка. Однак деякі компоненти можуть сорбуватися чи розкладатися в системі введення проби, колонці чи детекторі. Встановити можливість такої сорбції досить просто: слід приготувати суміш речовини, яка важко визначається, з інертним вуглеводнем та вводити її у хроматограф за різних розведень. Якщо відношення площ піків двох сполук залишається постійним, то досліджувана сполука в хроматографі не сорбується і не розкладається.

3. *Детектування.* Майже кожен детектор дає різний відклик на різні сполуки, тому при проведенні кількісного аналізу необхідно знати коефіцієнт чутливості. Відклик детектора міняється також при зміні робочих умов. Так, наприклад, щоб отримати правильні та відтворювані результати за допомогою катарометра, необхідні строго постійні потік газу-носія, температура детектора, струм нагріву, опір нитки чутливого елемента та зовнішній тиск.

4. *Реєстрація.* Помилки можуть виникати і на стадії реєстрації результатів аналізу самописцем. Щоб виключити можливість їх появи, необхідно вибрати робочий інтервал, визначити область лінійності, швидкість протягування діаграмної стрічки, швидкість руху пера, мертвий хід та електричний нуль. Точність вимірювань встановлюється за допомогою стандартів.

5. *Оцінка утримування піків.* Вірогідно, найбільш відповідальним етапом є перетворення хроматографічних піків в числові дані, які відповідають складу зразка. Це питання ми обговоримо окремо.

6. *Розрахунки.* Отримані числові дані, що відповідають площам чи висотам піків, повинні бути пропорційні концентрації компонентів зразка. Це питання також буде розглянуто окремо.

Для кількісної оцінки хроматограм можна використовувати або висоту, або площу піків. Вибір методу оцінки залежить від вигляду та характеру кривих та технічних можливостей. Висоту піка виміряти набагато швидше, ніж його площу. Однак у кривих залежності висоти піка від кількості речовини

лінійна ділянка менша, ніж у кривій залежності площі піка від кількості речовини. Крім того, висота піка дуже залежить від робочих умов (температура, швидкість потоку газу-носія, розмір проби), які повинні через це витримуватися дуже точно на постійному рівні. Висота піка вимірюється за перпендикуляром від нульової лінії до максимуму піка незалежно від дрейфу нульової лінії.

Оскільки зміна робочих умов на площу піка впливає значно менше, їх непотрібно так ретельно підтримувати постійними. Тому для оцінки результатів розділення користуються площами піків. З метою вимірювання площ піків було розроблено декілька ручних методів, що дають задовільні результати. У наш час ці вимірювання проводяться з високою точністю електронними інтеграторами та комп'ютерами, а ручні методи використовуються порівняно рідко. Основна незручність ручних методів вимірювання площ полягає в тому, що всі піки повинні повністю поміщатися на стрічці самописця. Ця вимога дуже обмежує інтервал концентрацій компонентів суміші, що аналізується. З великими труднощами пов'язані також відтворювані вимірювання площ маленьких та вузьких піків. Вимірювати площі піків можна наступними способами:

1. *Планіметрія.* Перевага даного способу оцінки полягає в тому, що характер та форма кривої в цьому випадку не мають значення. Площу піка вимірюють планіметром – механічним пристосуванням, призначеним для вимірювання площі будь-якої замкнутої фігури. Контури піка обводяться спеціальною голкою. Площу піка в абсолютних одиницях знаходять за різницею показань планіметра до і після цієї операції. Через низьку чутливість планіметра й особливості конструкції ним не можна виміряти ні дуже великі, ні дуже малі піки. Можливі також суб'єктивні помилки, які тим більші, чим більша площа піка. Метод трудомісткий, потребує багато часу і менш точний, ніж інші методи (відносна похибка близько 4%). Відтворюваність результатів вимірювань, проведених різними виконавцями, зазвичай незадовільна.

2. *Вирізування та зважування піків.* Цей метод використовується порівняно рідко. Як і в планіметричному методі, форма кривої не має значення. Метод потребує багато часу, але не може бути достатньо точним, особливо у випадку асиметричних піків. Необхідною умовою є гомогенність паперу, його постійна товщина та густина. Як правило, цим вимогам відповідає спеціальний діаграмний папір, що використовується у самописцях. Можливі також і суб'єктивні помилки, особливо при вирізуванні. Похибка визначення складає приблизно 2%.

3. *Добуток висоти піка на його ширину на половині висоти (квадрування кривої).* При використанні цього методу площа піка визначається як площа прямокутника: висоту піка множать на його ширину, виміряну на половині його висоти (рис. 4.20). Слід вимірювати відстань між зовнішньою стороною лінії однієї з гілок піка і внутрішньою стороною лінії другої його гілки. Для

більш точного вимірювання часто використовують вимірювальний мікроскоп. Ця методика досить проста і потребує небагато часу, але точність результатів вимірювань залежить від форми піка. Тому таким способом не можна визначати площі асиметричних піків чи піків з малою висотою та широкою основою. Окрім того, суттєвим недоліком методу є труднощі з вимірюванням напівширини вузьких піків. Задачу можна полегшити, прискоривши рух діагностичної стрічки для збільшення ширини піків. Похибка визначення площі симетричних піків складає близько 2,5%.

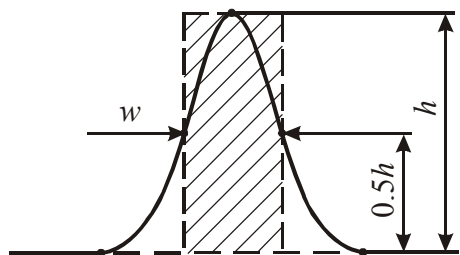


Рис. 4.20. Вимірювання площі піка, як добутку його висоти на півширину ($A = h \cdot w$).

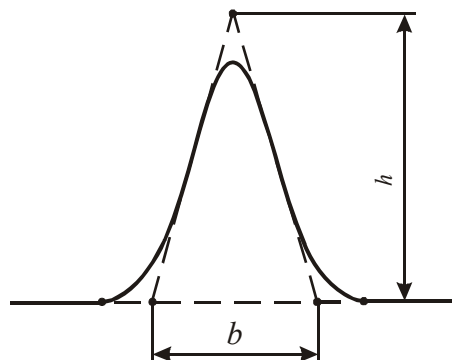


Рис. 4.21. Вимірювання площі триангуляційним методом ($A = h \cdot b/2$).

4. *Наближення до площі трикутника або триангуляція.* У цьому випадку площу піка вимірюють як площу трикутника (рис. 4.21) Висоту вимірюють від нульової лінії до точки перетину дотичних до точок перегину кривої. Методика відносно проста, і висоту таким способом визначити легко, але часом виникають труднощі у визначенні точок перегину гілок піка: при цій операції можливі суб'єктивні помилки. Цим методом не можна визначити площі вузьких та високих, а також асиметричних піків.

5. *Добуток висоти піка на час утримування.* Метод дає задовільні результати тільки за ізотермічного розділення, оскільки ґрунтується на припущенні, що залежність між шириною піка та часом утримування є лінійною. Перевага методу полягає в тому, що немає необхідності безпосередньо вимірювати ширину піків, тому він не такий чутливий до перекривання піків, як попередні два методи. При застосуванні його для вимірювання площі рівновисоких піків, що частково перекриваються (рис. 3.8, б), похибка не перевищить 1%.

Головне досягнення у вимірюванні хроматографічних піків за останні десятиріччя пов'язане з появою порівняно недорогих мікропроцесорів. Застосування цих пристроїв та побудованих на їх основі інтеграторів дозволило відмовитися від ручного вимірювання площі піків.

Кількісна оцінка хроматограм проводиться або безпосередньо, або за допомогою деяких видів калібрувань.

Прямий метод або *нормалізація* застосовується тільки в тих випадках, коли всі компоненти суміші хроматографуються з колонки і детектор дає лінійні та відтворені дані з однаковою чутливістю для всіх компонентів. Цим методом можна визначити хімічно подібні сполуки, наприклад алкілароматичні вуглеводні чи нормальні парафіни. При обробці результатів аналізу площі всіх піків сумують і концентрацію кожного компонента вважають пропорційною відношенню площі відповідного піка до суми площ усіх піків. Наприклад для суміші, що складається з чотирьох компонентів А, В, С і D, відсотковий вміст компонента А в суміші буде складати:

$$A = [A/(A + B + C + D)] \cdot 100, \quad (4.8)$$

де А, В, С і D – площі відповідних піків.

Площі, що відповідають окремим компонентам, не завжди пропорційні їх відсотковому вмісту, іншими словами, різні компоненти можуть давати різні сигнали, тому необхідно визначати поправочні коефіцієнти для кожного з них. Знайдені поправочні коефіцієнти можна використовувати для розрахунку відсоткового складу суміші. Оскільки принципи дії різних детекторів відрізняються, необхідно визначати поправочні коефіцієнти для кожного детектора окремо. Наприклад для розрахунку поправочних коефіцієнтів для ДПП готують калібрувальну суміш сполук А, В, С і D відомої маси і після розділення вимірюють площі, що відповідають окремим компонентам. Далі розраховують відношення площ і мас кожного компонента і отримують абсолютні поправочні коефіцієнти для даної суміші. Для розрахунку відсоткового вмісту окремого компонента у рівнянні (4.8) застосовують не площі піків, а відношення площі піка до поправочного коефіцієнта відповідного компонента.

Якщо одне з відношень прийняти за стандартне і поправочний коефіцієнт для нього прийняти за одиницю, а потім всі поправочні коефіцієнти привести до цього значення, тобто поправочні коефіцієнти для інших сполук отримують діленням їх відношень на відношення для стандарту, можна одержати відносні поправочні коефіцієнти.

Метод *внутрішнього стандарту* полягає в приготуванні сумішей, що містять відомі кількості чистих аналітів і внутрішнього стандарту у різних співвідношеннях, хроматографують їх, визначають площі отриманих піків і будують калібрувальну криву залежності відношення площ піків від відношення мас аналітів та стандарту. Внутрішній стандарт вибирають таким чином, щоб його час утримування не співпадав із жодним з компонентів суміші. Калібрувальна крива необхідна для визначення калібрувальної константи. У наведеному нижче прикладі для зручності запису алгебраїчних виразів вважатимемо, що потрібно кількісно визначити вміст лише одного компонента суміші. Нехай калібрувальна суміш містить m_X грамів сполуки X, яку потрібно визначити, та m_s грамів стандарту, а піки на хроматограмі, що відповідають цим сполукам, мають площу відповідно A_X та A_s . Тоді

$$m_X/m_s = \Phi \cdot A_X/A_s, \text{ тобто } \Phi = m_X A_s/m_s A_X, \quad (4.9)$$

де Φ – калібрувальна константа.

Тепер до зразка додають відому кількість m'_s стандарту і суміш хроматографують. Якщо площу піків сполуки, що визначається, та стандарту позначити відповідно через A'_X та A'_s , то

$$m'_X/m'_s = \Phi \cdot A'_X/A'_s. \quad (4.10)$$

Шляхом сумісного вирішення рівнянь (4.9) та (4.10) знаходимо масу сполуки X:

$$m'_X = (m_X A_s/m_s A_X) \cdot (m'_s A'_X/A'_s) \quad (4.11)$$

Наприклад, до 10 мл зразка додали 5 мл розчину внутрішнього стандарту з концентрацією 50 мкг/мл. Знайдене співвідношення площ дорівнює 8, відповідне співвідношення мас, знайдене з калібрувальної кривої, дорівнює 7. Повна кількість стандарту в 5 мл складає 250 мкг, отже у вихідній суміші міститься $7 \cdot 250 = 1750$ мкг компоненту, що визначається.

Якщо необхідно, загальне рівняння можна використовувати для будь-якого числа піків. За бажанням площі піків у рівнянні (4.11) можна замінити на висоти.

Метод внутрішнього стандарту має наступні переваги: не потрібно точно вимірювати кількість зразка, що вводиться, не потрібно визначати величину відклику детектора чи підтримувати її постійною, оскільки визначаються не абсолютні величини, а їх відношення. Головний недостаток методу – трудність підбору підходящого внутрішнього стандарту. Пік внутрішнього стандарту повинен не тільки повністю відділятися від піків інших компонентів суміші, але в той же час він повинен знаходитись досить близько від піка сполуки, що визначається, концентрація стандарту повинна бути близькою до концентрації цієї сполуки, і, нарешті, стандарт і сполука повинні бути структурно схожими. У випадку складних сумішей можна додавати два і більше внутрішніх стандартів.

Різновидом методу, описаного вище, є метод *стандартної добавки*. Він відрізняється лише тим, що стандартом, який додається, є один з компонентів суміші. Цей метод використовують головним чином тоді, коли неможливо, наприклад через погане розділення, підібрати підходящий внутрішній стандарт.

Застосування методу *зовнішнього стандарту* найбільш ефективно в тому випадку, коли наявні стандартні зразки усіх речовин, що входять до складу зразка. Спочатку готують стандартні розчини усіх цих сполук з відомою концентрацією і хроматографують їх. При цьому в колонку вводять кілька проб з різним вмістом сполуки, що визначається, з таким розрахунком, щоб визначити чутливість детектування даної сполуки в інтервалі концентрацій, що відповідає гаданому вмісту його в невідомій пробі. Для того щоб охопити достатньо широкий інтервал концентрацій, може знадобитися декі-

лька калібрувальних розчинів, щоб уникнути введення у колонку дуже великих об'ємів проби. В протилежному випадку результати вимірювань можуть виявитися невірними, оскільки за дуже великих концентрацій залежність сигналу детектора від концентрації стає нелінійною. Чутливість ψ для кожного стандартного розчину розраховують за рівнянням

$$\Psi = (\text{об'єм проби}) \cdot (\text{концентрація стандарту}) / (\text{площа піка}).$$

Чутливість вимірюється в одиницях маси на одиницю площі чи в одиницях маси на одиницю висоти піка. Потім у тих же умовах хроматографують досліджуваний зразок і знаходять масу кожного компонента, що міститься в ньому, множенням площі його піка на відповідне значення чутливості. Концентрацію потрібних аналітів вираховують шляхом ділення знайденої маси на об'єм уведеної проби. Цей метод дає можливість врахувати різну чутливість детектора до різних речовин і не вимагає обов'язкового хроматографування усіх компонентів проби з колонки. Необхідно тільки, щоб об'єм проби, що вводиться в колонку, був точно відомий; недостатня відтворюваність введення проби є найбільш поширеним джерелом похибок. Окрім того, слід досить часто перевіряти калібрування, особливо у тих випадках, коли умови дослідження змінюються. При роботі з детектором іонізації в полум'ї зміна витрати водню може призвести до значної зміни чутливості. Якщо аналіз ведеться за висотами піків, то особливо необхідно дотримуватися постійних умов дослідження, зокрема температури колонки та витрати газу-носія.

Метод *абсолютного калібрування*. В колонку вводять відому кількість речовини і розраховують площі отриманих хроматографічних піків. За отриманими даними будують калібрувальну криву залежності площі піка від відповідної кількості речовини. Калібрувальна крива повинна бути лінійною і повинна проходити через початок координат. Власне аналіз проводять наступним чином: вводять відому кількість суміші, що аналізується, встановлюють площі піків окремих компонентів, за калібрувальним графіком визначають відповідну кількість кожного компонента суміші і переводять у відсотки. Метод абсолютного калібрування має ряд недоліків. Зокрема, необхідно точно визначати масу зразка, що вводиться у колонку, умови хроматографування повинні бути постійними. Вся процедура займає багато часу. Однак він залишається найбільш точним методом, а при аналізі утримування речовин, що містяться у суміші в малих кількостях, тільки він один дає надійні результати.

Препаративна газорідина хроматографія застосовується для одержання невеликих кількостей чистих речовин з метою ідентифікації чи використання у наукових дослідженнях. Хроматографічні методи розділення характеризуються високою ефективністю, можливістю розділення за один цикл багатокомпонентних сумішей, універсальністю, високим виходом цільових речовин. Важко знайти інший метод розділення, що дозволяв би виділити з багатокомпонентної суміші, одержаної, наприклад, у результаті синтезу, потрібний компонент, якщо кількість цієї суміші складає кілька мілілітрів, або

й кілька крапель. Методом препаративної ГРХ можна ділити не тільки штучно синтезовані, але й природні суміші, його можна використовувати також для накопичення домішок та відділення їх від основного компонента з метою подальшого їх аналізу.

Основні особливості загальної схеми препаративного хроматографа пов'язані із застосуванням колонок більшого діаметру, ніж діаметр колонок, що застосовуються в аналітичних хроматографах, а також із введенням значно більших об'ємів суміші. Окрім того, якщо аналітичні хроматографи, як правило, являють собою прилади з ручним управлінням, у всякому разі з ручним дозуванням суміші аналітів, то препаративні хроматографи частіше за все виготовляються як повністю автоматичні. Виключенням є прилади, що застосовуються і як аналітичні, і як препаративні. Відповідно в комплект препаративного хроматографа входить зазвичай автоматичний дозатор проб, випаровувач, більш потужний, ніж у аналітичному приладі, а на виході з колонки – автоматичний колектор фракцій з системою вловлювачів, у які направляється газовий потік по мірі хроматографування з колонки цільових компонентів. В препаративних хроматографах застосовуються звичайні аналітичні детектори (ДТП, ДП), на які відводиться невелика частка (близько 1%) газового потоку з колонки.

Діаметр препаративних колонок залежить від виробника приладів і як правило лежить у межах від 6 до 30 мм, довжина також може сягати значних величин – до 20-30 м.

Автоматичне дозування рідких проб зазвичай здійснюється або механічними поршневыми дозаторами, або за принципом пневмопоршня, тобто під дією тиску газу. Об'єм рідкої суміші, що може вводиться дозатором складає 0,5-5мл.

Іншим вузлом, характерним для препаративних хроматографів, є пробовідбірний пристрій. В період інтенсивного розвитку препаративної ГРХ було запропоновано чимало варіантів таких пристроїв, котрі нарешті звелися до трьох основних типів: клапани, що перемикають потік перед вловлювачами; клапани, що перемикають потік потік після вловлювачів; пристрої карусельного типу, у яких вловлювачі по черзі підводяться до вихідного штуцера хроматографу й ущільнюються. Пристрої першого типу не знайшли широкого використання, оскільки не гарантували герметичність клапану в положенні “закрито” і відповідно не виключали забруднення фракцій, що відбираються, сторонніми компонентами. Трудність герметизації обумовлена знаходження клапану в гарячій зоні в умовах контакту з компонентами, які розділяються, що різко звужує коло ущільнюючих матеріалів. З цієї точки зору пристрої другого типу, у яких клапани знаходяться в холодній зоні і не контактують з компонентами, що розділяються, мають значні переваги і успішно застосовуються у наш час. Пробовідбірні пристрої третього типу, незважаючи на громіздкість та складнощі з налагодженням, повністю виключають можливість забруднення цільових компонентів іншими, оскільки в цьому

випадку вловлювачі не зв'язані між собою і деяка негерметичність при підході вловлювача до штуцера колонки призводить лише до втрат компоненту в атмосферу, а не у сусідній вловлювач. Усі вловлювачі фракцій знаходяться у спільній посудині Дьюара, де охолоджуються рідким азотом чи охолоджувальною сумішшю для зменшення втрат цільових компонентів з газом-носієм. Часом з метою повного вловлювання туману практикують його барботування через охолоджений леткий розчинник (ефір чи ацетон). Оскільки препаративні хроматографи розраховані на відбір обмеженого числа фракцій (до 6-10), а суміш може містити значно більше компонентів, газ-носії після вловлювання фракцій направляється в кінцевий вловлювач, який знаходиться в окремій посудині Дьюара. Доцільно проводити розділення у два етапи: спочатку виділяти вузьку фракцію і лише потім домагатися необхідної чистоти продукту.

Один з недоліків препаративної хроматографії пов'язаний із зниженням ефективності розділення при збільшенні діаметру колонок, часточок адсорбенту і розміру дози. Внаслідок цього її важко застосовувати для розділень, що потребують високої ефективності, наприклад для розділення ізотопнозаміщених молекул, близьких за властивостями ізомерів, енантіомерів тощо. За останні десятиліття, однак, намітився певний прогрес, пов'язаний з розвитком циркуляційної хроматографії. Сутність останньої полягає в тому, що суміш, яку розділяють, пропускають багато разів через одну і ту ж колонку. Таку циркуляцію можна здійснити або за допомогою спеціального циркуляційного насосу, або за допомогою кранів. Перший спосіб не отримав практичного розвитку у газовій хроматографії через сильне розмивання хроматографічної зони при проходженні її через насос, хоча з успіхом використовується в рідинній хроматографії. Зате спосіб із використанням кранів знаходить застосування в газорідинній хроматографії. Метод циркулярної хроматографії має очевидні переваги в порівнянні з простим подовженням колонок, що пов'язане з економією нерухомої фази, сорбенту, зменшенням геометричних розмірів апаратури, зниженням тиску газу-носія в системі.

Принцип циркуляційної хроматографії пояснює рис. 4.22. Схема включає дві однакових колонки 2 та 3, зв'язані двома розподільниками 1, які об'єднані в одному корпусі, а також детектор 4. В положенні I розподільників проба вводиться в першу колонку. Після того, як хроматографічні зони компонентів, що розділяються, перемістяться у другу колонку, про що судять з показань детектора, розподільники перемикають у положення II; при цьому колонки ніби міняються місцями за напрямком руху газу-носія: перша стає другою, а друга – першою. Перемикаючи таким чином колонки, пробу можна неодноразово пропускати через дві колонки до тих пір, поки сумарна ширина усіх піків не перевищить довжину однієї з колонок. Очевидно, що циркуляційну схему немає сенсу застосовувати для розділення багатокомпонентних сумішей, її застосування виправдано лише для вищезазначених пар сполук, що дуже важко розділяються звичайною препаративною ГРХ.

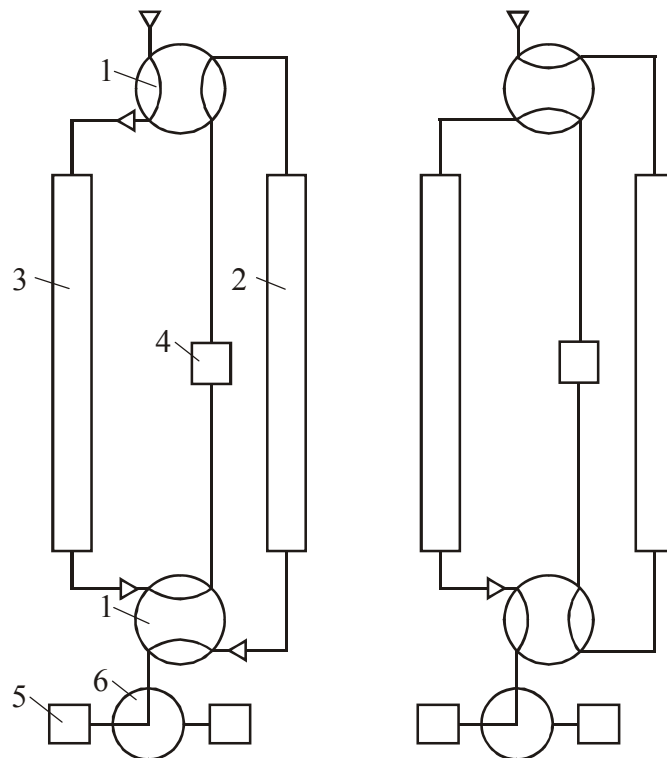


Рис. 4.22. Схема циркуляційної установки: 1 – циркуляційний кран; 2,3 – колонки; 4 – детектор; 5 – кран для відбору фракцій; 6 – вловлювачі.

Дослідження фізико-хімічних властивостей речовин. У наш час застосування газової хроматографії у неаналітичних цілях, тобто як методу дослідження термодинамічних характеристик систем, теорії сорбційних процесів, каталізу та інших областей фізичної хімії. Особливо важливо, що хроматографічний метод дає можливість досліджувати фізико-хімічні властивості індивідуальних сполук у суміші з іншими сполуками, оскільки хроматографування призводить до розділення суміші.

В основі визначення фізико-хімічних характеристик за допомогою газової хроматографії лежить відомий функціональний зв'язок цих характеристик з параметрами хроматографічного дослідження: величинами утримування та шириною хроматографічного піку. Перші є функцією коефіцієнту розподілу чи величини адсорбції, що дозволяє визначити коефіцієнти активності, термодинамічні функції адсорбції чи розчинення, структуру досліджуваних сполук і інші характеристики газоподібних, рідких чи твердих речовин. Ширина хроматографічного піку може бути мірою кінетичних явищ, оскільки вона пов'язана з розмиванням хроматографічної зони. Останнє визначається ефективним коефіцієнтом дифузії. Нарешті, з кількістю речовини, що сорбувалася, пов'язані висота та площа піку, внаслідок чого ці величини можуть слугувати основою для визначення ізотерм сорбції, поверхні сорбенту та ряду інших сорбційних характеристик.

Хроматографічний метод дозволяє визначити наступні фізико-хімічні характеристики речовин:

- 1) коефіцієнти розподілу та активності;
- 2) термодинамічні функції розчинення чи адсорбції;
- 3) ізотерми адсорбції;
- 4) характеристики специфічної взаємодії;
- 5) структуру сполук;
- 6) пружність пари та температуру кипіння чистих сполук;
- 7) поверхню, пористість і структуру часточок твердих речовин;
- 8) коефіцієнти дифузії у газах та рідинах;
- 9) кінетичні характеристики;
- 10) фізичні властивості речовин (температури фазових переходів, діелектричні сталі, в'язкість, молекулярні маси тощо).

Визначення *молекулярної маси* робиться за допомогою детектора густини газів. Суміш певної речовини з молекулярною масою M_X і стандарту з відомою молекулярною масою M_s хроматографують двічі з різними газами-носіями (з молекулярною масою M_1 та M_2). Площі піків і молекулярні маси зв'язані наступним співвідношенням:

$$\frac{A_X}{A_s} \left(\frac{M_s - M_1}{M_X - M_1} \right) = \frac{A'_X}{A'_s} \left(\frac{M_s - M_2}{M_X - M_2} \right), \quad (4.12)$$

де A_X та A'_X - площі піків речовини, для якої визначається молекулярна маса; A_s та A'_s - площі піків стандарту.

Із співвідношення (4.12) визначають шукану величину M_X .

Для визначення *температур кипіння* користуються залежністю часів утримування членів гомологічного ряду на неполярній нерухомій фазі від їхніх температур кипіння. За допомогою кривої, що виражає залежність часів утримування або утримуваних об'ємів членів гомологічного ряду, для яких відомі температури кипіння, від величин останніх, можна для інших членів ряду, знаючи їх елюційні характеристики у тих самих умовах, визначити температури кипіння. З меншою точністю можна оцінити температури кипіння, користуючись кореляцією для сполук іншого класу.

Контроль і регулювання технологічних процесів. Контроль технологічних процесів здійснюють за допомогою промислових хроматографів, датчики яких з'єднані безпосередньо з технологічним устаткуванням. Промисловий хроматограф може регулювати склад аналізованого потоку, подавати керуючі сигнали на регулятори відповідно до результатів аналізу, на електронно-обчислювальні пристрої тощо. Вартість хроматографа на нафтохімічному заводі окупається за декілька тижнів за рахунок поліпшення якості продукції і різкого зниження числа лабораторних аналізів.

Промисловому хроматографу пред'являються підвищені вимоги: а) надійність у роботі; б) стабільність умов хроматографування (витрата і тиск га-

зу-носія, температура термостата, розмір проб, що вводяться у колонку); в) відтворюваність результатів (низька летучість нерухомої фази, сталість роботи детекторів); г) мінімальна тривалість аналізу; д) сувора пропорційність вихідного сигналу концентрації цільового компонента.

Датчик промислового хроматографа повинний здійснювати введення газоподібної або рідкої проби відтворюваного розміру за програмою та без участі людини. Зазвичай застосовують мембранні, золотникові й інші конструкції дозаторів.

Колонки більшості промислових хроматографів виготовлені з нержавіючої сталі та мають спіральну, рідше U-подібну форму, внутрішній діаметр трубок коливається від 2 до 6 мм, довжина – від 0,4 до 15 м. Використовуються тільки набивні колонки. Це диктується необхідністю забезпечення відтворюваності колонок, при заміні яких не відбувалося б значної зміни характеру розділення.

Набивкою може бути або адсорбент, або інертний носій з нерухомою рідкою фазою, до стабільності якої пред'являються особливо жорсткі вимоги. Якщо тиск пари фази за робочої температури не перевищує 10^{-4} Па, то можна розраховувати на стабільну роботу колонки більше року. Коли тиск пари перевищує 10^{-3} Па, кількість рідкої фази швидко зменшується, а отже, зменшуються часи утримування компонентів, що призводить до частих змін калібрувальних графіків та необхідності додаткового налагодження програмуючого пристрою.

Програмуючий пристрій є основною частиною системи управління. Цей пристрій може подавати командні імпульси для переключення соленоїдного клапана (через який подається повітря управління); автоматичного встановлення нуля реєстратора; зміни масштабу шкали, відключення реєстратора на час, коли хроматографуються компоненти, що не підлягають реєстрації; зміни швидкості руху та зупинки діаграмного паперу тощо. В системі управління входить також стабілізоване джерело живлення детектора.

Детектором у промисловому хроматографі може бути катарометр чи детектор за густиною газів, що відрізняються простою конструкцією та стабільністю в роботі. З високочутливих детекторів застосовують часом детектор іонізації в полум'ї. Чутливість приладів коливається від 10^{-4} до $10^{-2}\%$.

Система реєстрації. Особливістю промислової хроматографії є необхідність визначення у суміші лише одного чи кількох цільових компонентів. Запис хроматограми може проводитися або у безперервному режимі (тобто реєстратор постійно записує сигнал детектора), або тільки тоді, коли з колонки хроматографуються цільові компоненти. Решту часу діаграмна стрічка рухається з меншою швидкістю, а перо реєструє нульову лінію. Можна використовувати вторинні реєстратори (по кількості речовин, що визначаються); на їх діаграмних стрічках безперервно записуються зміни висот піків. Це дає можливість судити про зміну концентрації кожного цільового компонен-

та. Електропневматичний перетворювач дозволяє одержувати вихідний пневматичний сигнал, пропорційний сигналу реєстратора.

Підготовка проби, що аналізується на промисловому хроматографі, зводиться до видалення твердих та рідких домішок, нагрівання чи охолодження, зниження чи підвищення тиску тощо. Про значення системи підготовки проби свідчить той факт, що вартість часом у 1,5 рази перевищує вартість самого промислового хроматографа. Особливу увагу слід приділити тому, щоб склад проби, що подається у колонку, відповідав складу потоку, що аналізується, тобто щоб в системі відбору проби не відбувалося ніяких хімічних перетворень чи сорбційних процесів за участю компонентів проби. Якщо хроматограф аналізує декілька потоків, то в систему відбору проби входить пристрій для їх переключення. Проба може проходити через дозатор або безперервно, або на протязі невеликих проміжків часу перед уведенням її у колонку. Слід лише забезпечити десятикратну продувку чи промивку дозатора. Нарешті, тиск на виході з дозатора повинен бути постійним (атмосферним), оскільки його зміна викличе зміну кількості проби, що відбирається.

Газ-носій вибирають у відповідності з типом детектора і необхідної чутливості методу. У більшості випадків при роботі з катарометром застосовують гелій. Однак вартість гелію висока, окрім того необхідна організація спеціального балонного господарства. Тому там, де можливо, слід використовувати як газ-носій повітря КВП, що є на підприємствах практично у необмеженій кількості. Газ-носій необхідно очищати від механічних домішок та вологи. Точка роси його не повинна перевищувати -40°C , що відповідає вмісту вологи близько $0,12 \text{ г/м}^3$. При використанні ДП газом-носієм може бути азот, аргон чи гелій.

Калібрування промислових хроматографів проводиться двома способами: шляхом аналізу суміші відомого складу чи шляхом паралельних аналізів потоку на промисловому та лабораторному приладах. Зрозуміло, що другий метод простіший і ним користуються частіше. Згідно літературних даних, похибка результатів, одержаних на промислових хроматографах, складає 1-2%, а відтворюваність коливається від 99,5 до 98%. Оскільки у колонку поступають проби сталого об'єму, результати аналізу можна виражати або у об'ємних відсотках, або у одиницях маси компоненту на одиницю об'єму проби, але не у масових відсотках. Для визначення складу проби у масових відсотках ставлять аналізатор густини чи проводять відповідні лабораторні аналізи.

Промислові хроматографи з успіхом використовуються для аналізу газів піролізу етану і пропану, алкілування ізобутану, виробництва бутадієну, ксилолів, окису етилену, для контролю повноти вловлювання розчинників з повітря при виробництві ацетилцелюлози, карбаміду, коксування вугілля.

Хроматомас-спектрометрія. Прилади, що випускаються промисловістю, є комбінацією капілярного газорідного хроматографа та мас-спектрометра,

між якими часом знаходиться сепаратор, функція якого - відділення компонентів проби, що розділяється, від газу-носія і перенос його у вакуумовану іонізаційну камеру мас-спектрометра. За допомогою останнього знаходиться бруто-формула сполуки і шляхи фрагментації молекулярного іону, що часто достатньо для визначення структури речовини. Можливість одержання моментальних мас-спектрів у різних точках хроматографічної зони дозволяє установити факт накладення погано розділених піків двох або декількох речовин і одержати інформацію про структуру кожного з них.

4.4. Високоефективна рідинна хроматографія

Низька лінійна швидкість хроматографування (до 0,02 см/с) обмежує можливості елюційної колоночної хроматографії, де застосування більш ефективних дрібнодисперсних адсорбентів або збільшення довжини колонок пов'язане із значним збільшенням часу всього процесу, що призводить до розмивання хроматографічних смуг внаслідок дифузії. Застосування хроматографічних систем, що працюють за підвищеного тиску, дозволяє підвищити швидкість елюції до 0,1-0,5 см/с і тим самим різко скоротити час хроматографування та підвищити ефективність через застосування нових вузькодисперсних сорбентів з діаметром часточок від 3 до 10 мкм. Саме тому 70-80 роки минулого століття характеризуються бурхливим прогресом інструментальної високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Причин швидкого розвитку ВЕРХ декілька. Перш за все слід назвати великий діапазон молекулярних мас речовин, з якими можна працювати: від кількох десятків до кількох мільйонів, що набагато ширше, ніж у газовій хроматографії. Окрім того, у ВЕРХ майже всі розділення можна проводити за кімнатної або близької до неї температури та відсутності контакту з повітрям, що робить її особливо придатною або навіть єдиною системою для аналізу лабільних сполук. Ефективність розділення (до 200000-300000 т.т. на 1 м) суттєво перевищує досягнуту у газовій хроматографії. Метод ВЕРХ дає можливість препаративно виділити із складної суміші у м'яких умовах чисті сполуки, які можна далі досліджувати іншими фізико-хімічними методами.

За масштабом розділення ВЕРХ ділиться на мікроколоночну (колони діаметром до 2 мм), аналітичну (2-6 мм), напівпрепаративну (7-10 мм) та препаративну (10-40 мм). Хоча цей поділ досить умовний, тим не менше він досить зручний, через те що в залежності від поставленої задачі вимоги до апаратури відчутно міняються. Правильно вибраний масштаб роботи дозволить найбільш ефективно використовувати дорогі розчинники та сорбенти при отриманні бажаного результату.

За механізмом розділення ВЕРХ не відрізняється від звичайної колоночної хроматографії, тобто ділиться на адсорбційну, розподільчу, іонообмінну та ексклюзійну. Кожен з механізмів розділення має свої особливості. Слід, однак, мати на увазі, що в практичній роботі розділення часто протікає не за

одним механізмом, а за декількома одночасно. Так ексклюзивне розділення буває ускладненим адсорбційними ефектами, адсорбційне – розподільчими, і навпаки. При цьому чим більша різниця речовин у пробі за ступенем іонізації, основністю, кислотністю, молекулярною масою, полярністю тощо, тим більша вірогідність прояву специфічних механізмів сорбції.

4.4.1. Блок-схема приладу для рідинної хроматографії

На рис. 4.23 зображена блок-схема рідинного хроматографа, який складається з резервуарів для розчинника 1, насосної системи 2 з демпфером 3, системи введення проби 4, колонки 5, детектуючої системи 7 та реєстраційно-обчислювального модуля 8. Для проведення аналізів за температур, відмінних від кімнатної, дозатор та колонка можуть знаходитися у термостаті 6. Крім того, препаративні прилади часто постачаються колекторами фракцій. У більшості сучасних аналітичних та препаративних приладів усіма необхідними процесами (контроль витрати РФ, формування градієнту РФ, автоматичне введення проби, управління колектором фракцій, температура термостату тощо) управляє так званий центральний процесор 10 (модуль управління).

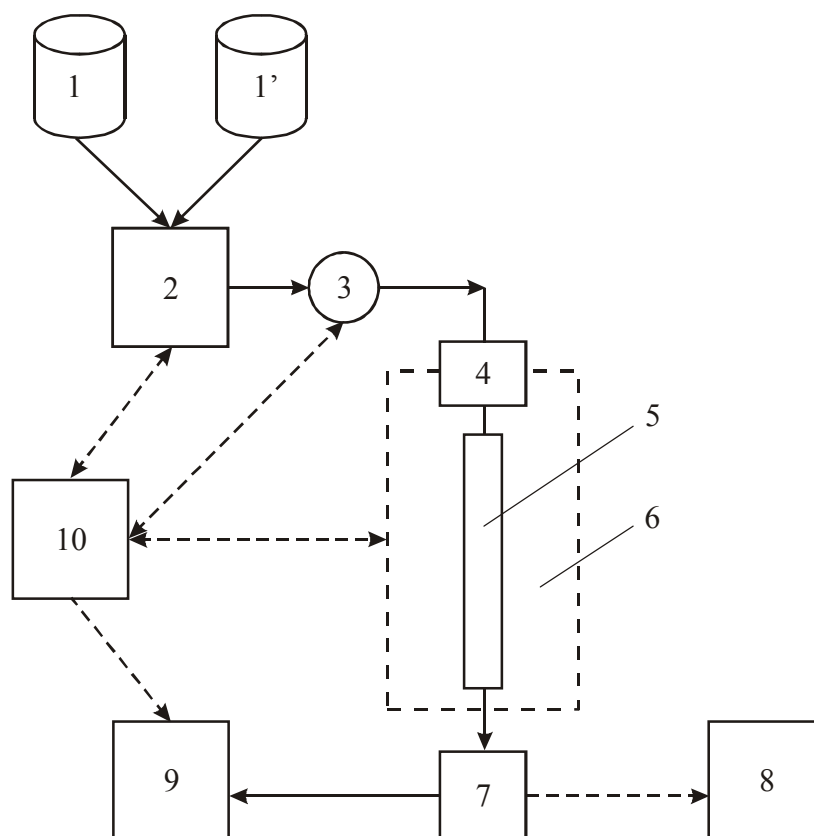


Рис. 4.23. Блок-схема вискоєфективного рідинного хроматографа (ВЕРХ): 1(1') - резервуар для розчинника; 2 – насосна система; 3 – демпфер з датчиком тиску; 4 – дозатор; 5 – колонка; 6 – термостат; 7 – детектор; 8 – самописець (система обробки даних); 9 – колектор фракцій; 10 – модуль управління.

Резервуар для рухомої фази (елюенту). Основний матеріал, з якого виготовляються ємності для елюенту, – це скло. З цією ж метою використовують поліетилен, поліпропілен, тефлон чи нержавіючу сталь. Дуже часто елюент необхідно звільнити від розчинених у ньому газів, у таких випадках застосовують резервуари закритого типу, у кришках яких є отвори для введення інертного газу чи підключення вакууму. В процесі дегазації вміст резервуару можна перемішувати магнітною мішалкою. Дегазацію проводять пропусканням інертного газу (краще за все гелію) з витратою перші 15 хв 200 мл/хв, а потім на протязі усієї роботи 20-40 мл/хв. За відсутності інертних газів дегазацію можна провести, вакуумуючи резервуар з елюентом до залишкового тиску 40000-50000 Па на протязі 15-20 хв за інтенсивного перемішування або нагріванням компонентів РФ майже до температури кипіння. Дегазація особливо бажана при роботі з плунжерними насосами для запобігання утворення повітряних корків у насосі, колонці чи детекторі, що може викривити результати аналізу. Елюент із резервуару засмоктується у насос через пористий металевий фільтр з діаметром пор не більше 5 мкм для запобігання попадання в хроматографічну систему механічних забруднень.

Насосна система. Сучасні насоси для ВЕРХ являють собою прецизійні пристрої, що забезпечують постійну подачу РФ у колонку і здатні створювати тиск до 50 МПа. Продуктивність насосів знаходиться у діапазоні від 1 мкл/хв (мікроколоночна ВЕРХ) до 25-100 мл/хв (препаративна ВЕРХ).

Насоси для ВЕРХ повинні задовольняти наступні вимоги: хімічна інертність матеріалів по відношенню до компонентів РФ; досить високий робочий тиск (не нижче 15-20 МПа); висока стабільність швидкості потоку РФ. Окрім того, бажано, щоб насос працював без пульсацій і мав невеликий робочий об'єм для швидкої зміни розчинників в режимі градієнтної елюції.

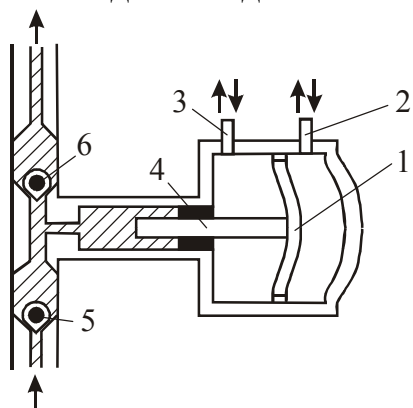


Рис. 4.24. Схема насоса постійного тиску: 1 – поршень повітряного циліндра; 2, 3 – штуцери подачі повітря; 4 – поршень насоса; 5 – вхідний клапан; 6 – вихідний клапан.

Усі насоси в ВЕРХ діляться на дві групи: постійної витрати та постійного тиску. Основною перевагою насосів постійного тиску є висока продуктивність та відсутність пульсацій. Найбільш вдалою конструкцією насосів цього типу є насос з пневмомпідсилювачем, принципова будова якого показана на рис. 4.24. Поршень 1 великого діаметру, що приводиться у дію стиснутим газом, який поступає через штуцер 2, зв'язаний з поршнем 4 меншого діаметру, який через систему клапанів 5 та 6 здійснює подачу

рідини з резервуару у колонку. Для швидкого перезаповнення насоса зворотній хід поршня відбувається під дією тиску газу, який поступає через штуцер

3. Максимальний тиск, що його розвиває такий насос, залежить від відношення площ поршнів та тиску газу на вході.

Головний недолік насосів постійного тиску – зміна витрати РФ при зміні опору системи. Опір колонки може підвищитися через забруднення вхідного фільтра, набивки тощо. Він змінюється із зміною в'язкості розчинника, яка в свою чергу залежить від температури і практично завжди коливається в режимі градієнтної елюції. Тому насоси даного типу поступово витісняються насосами постійної витрати і застосовуються, головним чином, у препаративній хроматографії та для заповнення колонок.

Насоси постійної витрати діляться на дві основні групи: шприцові та зворотно-поступальні. Шприцові, як витікає з їх назви, за конструкцією являють собою шприц досить великої місткості (100-500 мл), в якому електродвигун через силову передачу переміщує поршень, який видушує розчинник з постійною швидкістю. Після проходження всього робочого об'єму шприца потік переривається для перезавантаження поршня. Через цей недолік та складність виготовлення ущільнень великого діаметру шприцеві насоси середньої продуктивності (5-10 мл/хв) практично вийшли з ужитку. Однак у зв'язку з швидким розвитком мікроколоночної хроматографії, у якій витрата РФ порівняно невелика, спостерігається повернення саме до цієї системи, важливими перевагами якої є висока точність подачі РФ, відсутність пульсацій та клапанів.

Зворотно-поступальні насоси використовуються у ВЕРХ найбільш широко, оскільки вони задовольняють більшість вимог. Практично єдиний їх принциповий недолік – пульсація потоку, для згладжування якої необхідно застосовувати спеціальні демпфери. Менш суттєві недоліки – порушення нормальної роботи клапанів через їх забруднення механічними домішками в РФ та утворення парових корків під час такту всмоктування при роботі з розчинниками, що мають високий тиск пари (пентан, метиленхлорид тощо). Ці насоси бувають двох типів: поршневі або плунжерні, та мембранні або діафрагмові. В обох випадках переміщення розчинника відбувається за рахунок зворотно-поступального руху поршня чи мембрани в порожнині, обмеженій кульковими клапанами.

В мембранних насосах поршень переміщується в порожнині з оливою, викликаючи знакоперемінні вигинання мембрани, закріпленої з іншої сторони порожнини. Перевагою таких насосів є відсутність контакту розчинника з ущільненням поршня. При цьому суттєво знижуються вимоги до матеріалу ущільнення поршня, а продукти його ерозії не можуть забруднити клапани. Зміна продуктивності насосу здійснюється або зміною робочого об'єму циліндра (через обмеження ходу поршня), або зміною частоти переміщення поршня. Другий спосіб забезпечує більш точну подачу розчинника, особливо за низької витрати.

Принципова схема плунжерного насоса з однією голівкою і постійним ходом поршня, що забезпечує синусоїдальну характеристику подачі розчин-

ника, зображена на рис. 4.25. Електродвигун 1 через ексцентрик 2 приводить у рух поршень 3, який через ущільнення 4 входить у циліндр 5 із вхідним 6 та вихідним 7 кульковими клапанами. У фазі нагнітання клапан 6 закривається, а клапан 7 відкривається, і розчинник подається у колонку. Зворотна пружина 8 при відповідному положенні ексцентрика 2 повертає поршень назад: при цьому у циліндрі 5 виникає розрідження, клапан 7 закривається, а клапан 6 відкривається, і в циліндр засмоктується нова порція розчинника.

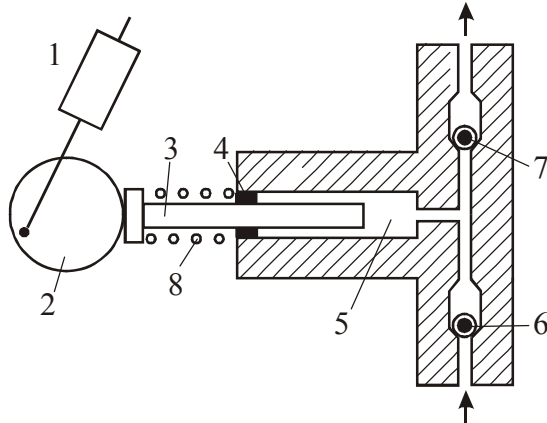


Рис. 4.25. Схема поршневого насосу постійної витрати: 1 – електродвигун; 2 – ексцентрик; 3 – поршень; 4 – ущільнення; 5 – циліндр; 6 – вхідний клапан; 7 – вихідний клапан; 8 – зворотна пружина.

В насосах із звичайною круглою формою ексцентрика тривалість тактів всмоктування та нагнітання однакова, що призводить до досить високого рівня пульсацій потоку. Пульсацію можна помітно знизити за рахунок використання ексцентриків спеціально розрахованої складної форми, які забезпечують різке скорочення тривалості такту всмоктування. По закінченні такту нагнітання відбувається швидке перезавповнення насосу й одразу ж починається новий цикл. Високої стабільності потоку також можна досягти суттєвим зменшенням

робочого об'єму насосу з одночасним збільшенням частоти руху поршня (до 50 Гц).

Недоліком описаних систем є підвищена схильність до утворення парових корків при роботі з низькокиплячими розчинниками, тому у деяких конструкціях введено спеціальне регулювання тривалості перезавповнення насосу.

Дуже часто для зниження пульсацій використовують насоси з двома, навіть трьома голівками та різні системи електронного регулювання. Рівень пульсацій у простого насоса з однією голівкою складає близько 9%; застосування двох голівок, які працюють у протифазі, знижує його приблизно до 3%, а трьох голівок із зсувом на 120° – до 1%. Найбільш складні насоси з трьома голівками малого робочого об'єму і спеціально розрахованою формою ексцентрика забезпечують подачу розчинника майже без пульсацій з нерівномірністю не більше 0,2%, а застосування схем електронного регулювання із зворотним зв'язком дозволяє знизити цю величину удвічі.

За тиску вище 10-15 МПа починає проявлятися здатність деяких розчинників стискатися, що призводить до зменшення швидкості потоку. Тому багато насосів постачають спеціальними системами корекції цієї здатності.

Перевагою поршневих насосів є можливість легко змінювати продуктивність за рахунок використання змінних голівок з іншим діаметром поршня. Зміна голівки чи блоку голівок займає 10-15 хв. До багатьох моделей на-

сосів випускаються змінні головки для препаративної хроматографії з продуктивністю 25-40 мл/хв, а деякі конструкції мають до трьох змінних голівок.

Більшість сучасних насосів обладнана показчиками та обмежувачами нижньої та верхньої межі робочого тиску. Тиск у хроматографічній системі є виключно важливим параметром і контролюється показчиками тиску з точними тензодатчиками. Об'єм датчиків зазвичай дуже малий, тому не викликає утруднень при заміні розчинника у градієнтному режимі. Обмежувачі тиску автоматично вимикають насос, якщо тиск виходить за межі встановленого діапазону, що суттєво підвищує безпеку роботи. Обмежувач верхньої межі також дуже корисний для запобігання псуванню колонок з деякими сорбентами, які можуть руйнуватися при перевищенні допустимого для них робочого тиску.

Однією з проблем плунжерних насосів є підбір матеріалу для поршня. Необхідно забезпечити його мінімальне зношення для збереження герметичності і в той же час звести до мінімуму забруднення РФ за рахунок механічних та хімічних домішок. У більшості сучасних плунжерних насосів поршні та кульки у клапанах виготовляють із штучних рубінів та сапфірів, що мають твердість дев'ять за десятибальною шкалою.

Різноманітність конструктивних рішень, направлених на стабілізацію витрати РФ призвела до того, що асортимент зворотньо-поступальних насосів, що випускаються різними фірмами у світі, досить широкий. У той же час не існує насоса, який би мав найвищі експлуатаційні характеристики для усіх можливих областей застосування. Так у насосі з трьома головками вірогідність забруднення клапана значно вища, а знайти забруднений клапан важче, ніж у насосі з однією головкою. Тому такі насоси слід використовувати тільки за необхідності найвищої точності подачі РФ, наприклад у ексклюзивній хроматографії. Можна вважати, що у більшості варіантів ВЕРХ Цілком задовільну роботу забезпечить насос з двома головками, оптимізованою формою ексцентрика і регулюванням витрати шляхом зміни частоти ходів поршня.

Градієнтні пристрої призначені для змішування двох чи більше елюентів різної природи для постійного збільшення елюційної сили РФ у відповідності з обраним законом. Це повинно забезпечити хроматографування з колонки речовин, що утримуються як слабо, так і сильно, з гарним розділенням у вигляді вузьких піків правильної форми та за відносно короткий час. Пристрої для формування градієнту можуть бути простими за конструкцією, чи складними в залежності від того, який градієнт потрібен, як часто він застосовується, яка насосна система тощо.

Найпростіший вид градієнту – ступінчастий, для його здійснення на вхід насосу встановлюють багатоходовий кран, котрим послідовно подають у насос розчинники від найслабкішого до найсильнішого, через обрані оператором проміжки часу повертаючи кран. Недоліком ступінчастого градієнту є різке відхилення нульової лінії детекторів, коли до вимірювальної комірки

доходить межа нового розчинника, а також труднощі проведення кількісного аналізу.

Один з простих пристроїв для створення плавного градієнту зображений на рис. 4.26. Він являє собою систему двох сполучених посудин конічної форми. Коли всі крани відкриті, рівні в посудинах з розчинниками А і Б однакові. По мірі витрати розчинників у насос буде поступати суміш, що містить все більше розчинника Б і все менше – розчинника А. Мінючи форму посудин, їх об'єм та форму, можна отримувати градієнти різного профілю – лінійного, експоненціального, увігнутого чи випуклого.

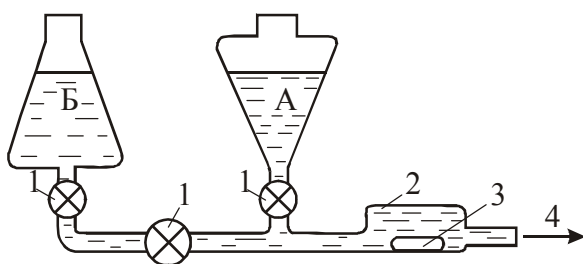


Рис. 4.26. Схема пристрою для створення градієнту низького тиску: 1 – кран; 2 – камера змішування; 3 – магнітна мішалка; 4 – до насосу; А і Б – слабкий та сильний розчинники.

Недоліком таких простих пристроїв є складність роботи з ними, низька відтворюваність, неможливість точного формування градієнту заданого профілю, а цінність їх полягає у тому, що в деяких випадках за допомогою порівняно дешевих саморобних пристроїв вдається вирішити задачі, які принципово не вирішуються у ізократичному режимі.

Пристрої для формування градієнту довільного профілю діляться на дві великі групи: пристрої для формування градієнту за низького тиску (на вході у насос) та за високого тиску (на виході з двох чи більше насосів).

Обидві групи мають свої недоліки та переваги.

Система формування градієнту за високого тиску зображена на рис. 4.27. Як видно з рисунку, програматор б управляє кроковими двигунами насосів, що подають розчинники А та Б у співвідношенні, яке постійно змінюється за обраним оператором законом. Розчинники поступають у динамічний змішувач з магнітною мішалкою, змішуються і подаються на інжектор та колонку. У порівнянні з ізократичною схема ускладнюється, а отже і коштує дорожче: додається ще один насос, програматор, змішувач. Якщо необхідним буде трьох- чи чотирьохкомпонентний градієнт, то для цієї схеми необхідно буде додатково ще 1 чи 2 насоси.

Схема формування градієнту за низького тиску наведена на рис. 4.28. Управління градієнтом також здійснює програматор, та управляє він електромагнітними клапанами, відкриваючи чи закриваючи той чи інший клапан за заданою програмою. Цим забезпечується подача на вхід насосу 4 суміші розчинників А та Б у заданому співвідношенні. Суміш перемішується у змішувачі магнітною мішалкою та подається на вхід насосу і далі на інжектор. Часом змішувач встановлюють після насоса на лінії високого тиску.

На перший погляд здається, що така система простіша та краща за попередню: клапанна система коштує дешевше ніж додатковий насос. Однак,

застосування клапанної системи формування градієнту потребує більш ретельної дегазації компонентів РФ та захисту їх від контакту з атмосферою. У протилежному випадку бульбашки, що утворилися при змішуванні розчинників, налипають у клапанах та поршневих камерах, насос перестає працювати. Тим не менше, якщо необхідний градієнт з трьох або чотирьох розчинників, прилад з градієнтом низького тиску при інших рівних умовах виявиться дешевшим.

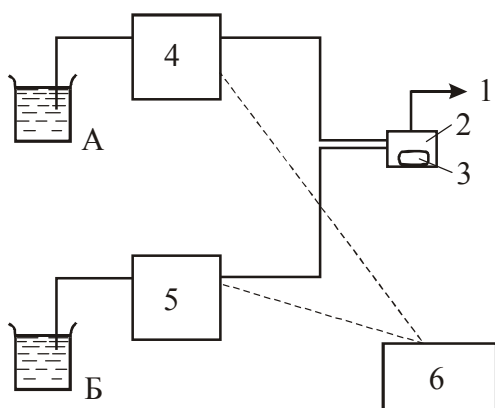


Рис. 4.27. Схема пристрою для створення градієнту високого тиску: 1 – до інжектора; 2 – змішувач; 3 – магнітна мішалка; 4 – насос для подачі розчинника А; 5 – насос для подачі розчинника Б; 6 – програматор.

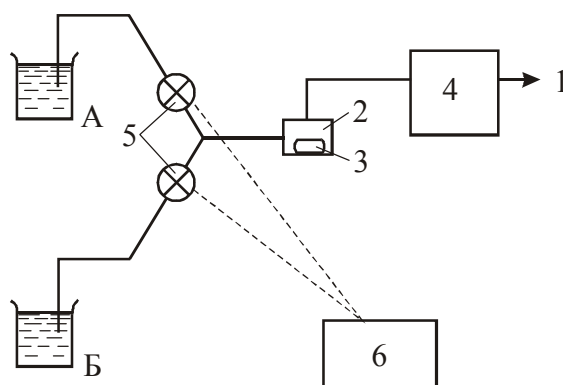


Рис. 4.28. Схема пристрою для створення градієнту низького тиску: 1 – до інжектора; 2 – змішувач; 3 – магнітна мішалка; 4 – насос; 5- клапани; 6 – програматор.

Демпфери. Найпростішим пристроєм для згладжування пульсацій може служити підключена через трійник система: навантажувальний опір (капіляр внутрішнім діаметром $\leq 0,5$ мм) – ємність (зазвичай трубка Бурдона манометра). Якщо трубка Бурдона заповнена рідиною, відбувається згладжування пульсацій за рахунок розсіювання частини енергії стиснутої рідини при розгинанні трубки. Падіння тиску на такому демпфері залежить від опору капіляра і може досягати 3–4 МПа. Однак при заміні одного елюента на інший залишки попереднього, не видалені з трубки Бурдона, будуть забруднювати новий елюент, порушуючи хід хроматографування, особливо якщо старий та новий елюенти не змішуються.

Гарними демпферами можуть бути прокатані (сплющені) тонкостінні трубки з нержавіючої сталі, скручені в спіраль у вигляді пружини. Проточний демпфер, виготовлений з трубки довжиною 1,8 м з зовнішнім діаметром близько 6 мм і товщиною стінки 0,5 мм знижує рівень пульсацій на 95% при робочому тиску 20 МПа.

Змінюючи діаметр, товщину та довжину трубки, отримують демпфери з найбільшою ефективністю в певному діапазоні робочого тиску. Слід відмітити, що проточні демпфери такої конструкції призводять до значного обме-

ження робочого тиску у системі, що заважає досягненню максимальної витрати РФ, особливо у обернено-фазовій хроматографії. Окрім того ці демпфери часто мають дуже значний внутрішній об'єм, що обмежує їх використання при градієнтній елюції.

У мембранних демпферах коливання потоку згладжуються за рахунок переміщення пружної металевої діафрагми (мембрани). З другої сторони до мембрани прикладають постійний тиск, створений газом, пружиною чи рідиною з високим коефіцієнтом стискування. Кращі конструкції мембранних демпферів мають маленький внутрішній об'єм і найбільш придатні для роботи з градієнтною елюцією.

Іншим рішенням проблеми є встановлення замість капіляра дозуючого клапана, розрахованого на високий тиск. Клапан може бути відрегульований на одержання мінімальних пульсацій або на мінімальне зниження тиску. Останній режим застосовується для препаративної роботи, коли необхідна велика витрата і не потрібна висока чутливість детектуючої системи.

Пристрій для введення проби (дозатор). В рідинній хроматографії найпростіший спосіб введення проби, як і в ГРХ, – за допомогою мікрошприца через еластичну мембрану, що сама ущільнюється. Звичайні шприци можна використовувати за тиску на вході у колонку до 10 МПа. Оскільки проба вводиться у вигляді розчину в потік елюенту прямо в колонку чи безпосередньо перед нею, здебільшого за нормальної температури, то за конструкцією дозатори нагадують відповідні пристрої для ГРХ, тільки без нагріву. Всі проблеми, пов'язані з нагріванням мембрани у ВЕРХ знімаються, однак виникають нові, з яких три основні: забезпечення герметичності в умовах високого тиску, набухання мембрани і можливість механічного забивання комунікацій та погіршення ефективності колонки внаслідок деструкції мембрани у процесі експлуатації (тобто при багаторазових проколюваннях шприцом). Вимоги до матеріалу мембрани в рідинній хроматографії набагато жорсткіші, ніж у газовій. Силіконові полімери, які дуже сильно набухають у неполярних органічних розчинниках, зазвичай застосовують з водними, водно-спиртовими чи іншими полярними РФ. Перфоровані еластомери підходять для роботи з вуглеводнями та іншими неполярними фазами. Ефективним є захист полімерних мембран тонкою плівкою з фторопласту. Однак ніякі міри не дозволяють повністю позбавитися недоліків, пов'язаних з наявністю мембран, тому у сучасних приладах мембранні системи введення проби застосовуються все рідше.

За робочого тиску вище 10 МПа використовують або спеціальні шприци високого тиску, або введення проби із зупинкою потоку РФ. Найпростіший інжектор із зупинкою потоку зображений на рис. 4.29. Він містить кран 4 для перекидання потоку РФ перед інжектором і трійник, до якого під'єднані колонка, капіляр для подачі розчинника та заглушка. Коли потрібно ввести пробу, зупиняють насос, перекидають кран, відкручують заглушку, вводять голку шприца з попередньо набраною пробєю до вхідного фільт-

ра колонки, наносять пробу, виймають шприц, закручують заглушку, відкривають кран та вмикають насос. Розмивання піків та погіршення ефективності за рахунок зупинки потоку мінімальні через дуже повільну дифузію у рідині. Інжектор простий за конструкцією, може бути виготовлений самостійно. Недоліки: багато ручних операцій, нестационарність потоку розчинника дає несправжній пік і утруднює кількісний аналіз.

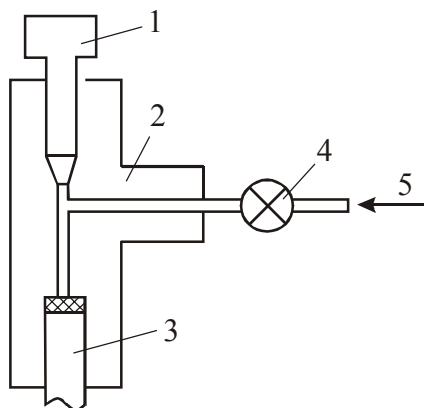


Рис. 4.29. Інжектор із зупинкою потоку розчинника: 1 – заглушка; 2 – корпус інжектора; 3 – колонка; 4 – кран; 5 – подача розчинника від насоса.

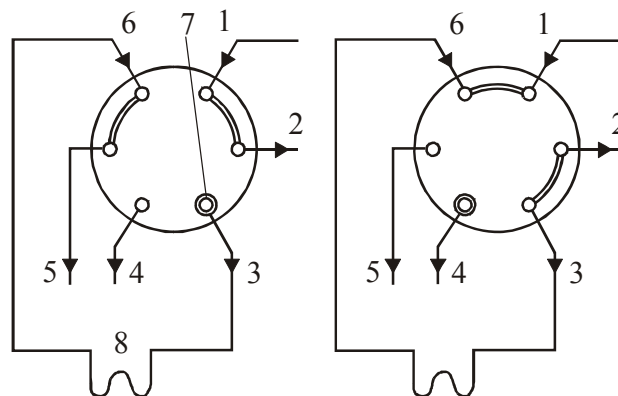


Рис. 4.30. Схема роботи інжектора фірми "Реодайн": 1 – подача РФ від насоса; 2 – до колонки; 3,6 – патрубки під'єднання дозувальної петлі; 4,5 - скидання; 7 – місце введення голки шприца; 8 – дозувальна петля.

Найбільш розповсюджені системи введення проби за допомогою інжекторів, що обертаються. Рідка проба шприцом вводиться в калібровану петлю і при повороті крану разом з потоком РФ переноситься у колонку. Принципова схема роботи інжектора такого типу фірми "Реодайн" зображена на рис. 4.30. В положенні "заповнення петлі" потік рухомої фази від насоса йде безпосередньо у колонку, а петля сполучається з лініями "введення проби" та "скидання" і знаходиться за атмосферного тиску. В цьому положенні петля промивається чистою рухомою фазою за допомогою шприца місткістю 2-5 мл від залишків попередньої проби, потім за допомогою мікрошприца у петлю вводиться певний об'єм проби. Для аналітичної роботи зазвичай використовують змінні петлі об'ємом 10 або 20 мкл. Якщо об'єм уведеної шприцом проби перевищує об'єм петлі, то дозований у колонку об'єм буде відповідати номінальному об'єму петлі. Можна заповнити лише частину петлі, тоді об'єм проби буде відповідати дозованому об'єму шприца. У другому випадку відтворюваність дозування проби набагато гірша, окрім того зростає роль дозатора в позаколонному розмиванні піків. Для кількісного аналізу використовують виключно перший спосіб, причому об'єм шприца перевищує об'єм петлі як мінімум у 5-6 разів. Це необхідно для повного витіснення з петлі розчинника пробою. Кран-дозатор повинен забезпечувати герметичність системи за високого тиску (до 70 МПа), мати мінімальні мертві об'єми і бути ви-

готовленим з матеріалів, інертних по відношенню до компонентів рухомої фази та проби.

Окрім інжекторів типу "Реодайн" із змінною зовнішньою петлею-дозою застосовуються інжектори із внутрішньою петлею. Внутрішні петлі являють собою канали певної місткості, виконані в тілі інжектора. Як правило, місткість внутрішніх петель коливається у межах 0,06-10 мкл, тому інжектори цього типу частіше застосовуються для мікроколоночної хроматографії.

Окрім ручних інжекторів існує багато конструкцій повністю автоматичних детекторів, які у відповідності до заданої програми можуть вводити від 20 до 100 і більше зразків. Вони забезпечують виконання всіх циклів введення проби: промивання петлі, заповнення, введення проби автоматично.

Необхідно також згадати і інжектори-насоси, здатні за командою подати на колонку проби певного об'єму і зупинитися. Їх застосовують у випадках, коли необхідно багато разів подати на препаративну колонку відтворено та без розмивання один і той самий зразок.

Колонки являють собою трубки з нержавіючої сталі, внутрішній діаметр яких коливається від 2-6 мм (аналітичні колонки) до 25-40 мм (препаративні колонки). Довжина колонок коливається у межах 50–1000 мм. Зазвичай вони мають форму трубки, але експериментально показано, що колонкам довжиною 500–1000 мм можна надавати U-подібної форми чи скручувати у спіраль без втрати ефективності. Зазвичай колонки довжиною 50 мм застосовують як попередні колонки для вловлювання забруднень, що вносяться в хроматографічну систему з пробєю, запобігаючи тим самим забрудненню основної колонки. Максимальний тиск, на який розраховані такі колонки – 70–100 МПа, однак максимальний робочий тиск як правило не перевищує 35–40 МПа.

Якщо робочий тиск не перевищує 7 МПа можна застосовувати скляні колонки. Якщо робочий тиск близький до вказаного, скляні колонки поміщають у кожухи з нержавіючої сталі. Сучасна технологія дозволяє виготовляти скляні колонки з точно витриманими внутрішніми діаметрами зазвичай 2, 4, 6, 9, 12 чи 25 мм і довжиною 150, 300, 600 чи 1000 мм. Дуже часто колонки мають ущільнюючий кожух, верхні і нижні кінцеві з'єднання колонок ідентичні і мають зовнішню різьбу.

В сталевих колонках накидні гайки з металевим ущільнюючим кільцем притискають до торців трубки пористі фільтри з розміром пор ~ 5 мкм на вході та ~ 2 мкм на виході. Фільтри колонок являють собою диски з пористої нержавіючої сталі товщиною від 0,5 до 1,6 мм. Міцність фільтра зростає з товщиною, але одночасно збільшується його мертвий об'єм. Найбільший вклад в розмивання хроматографічної зони на пористому фільтрі вносить кільцева зона, в яку впирається стінка колонки (рис. 4.31, а). Для видалення цієї зони фільтр колонки запресовують у кільце із достатньо жорсткого політрифторхлоретилену "Кел Ф".

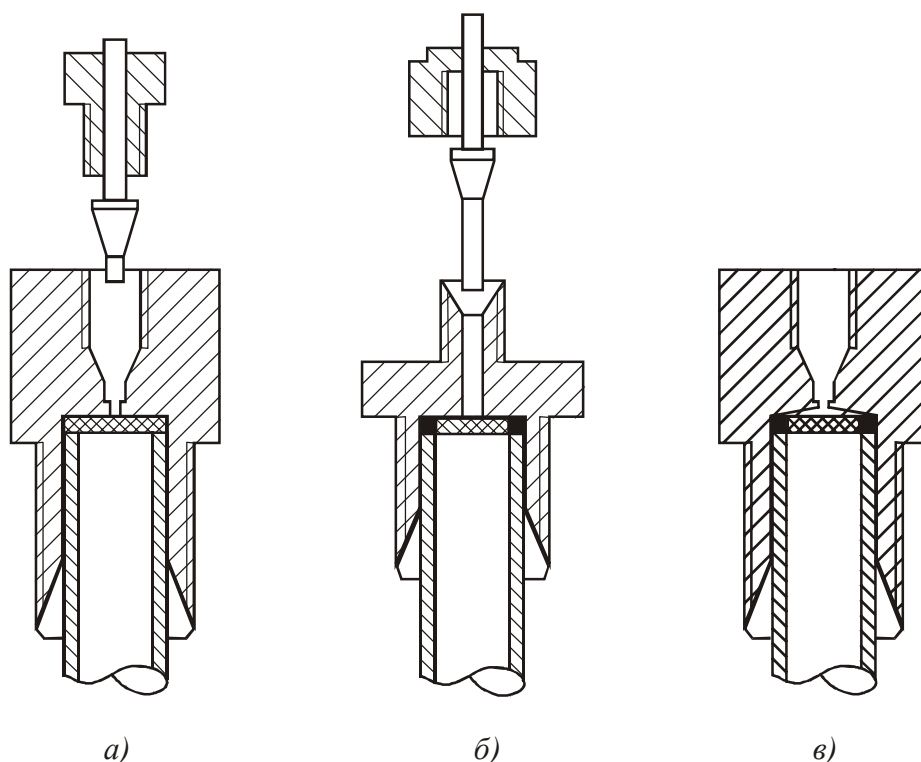


Рис. 4.31. Кінцеві з'єднання колонок: а) з'єднання з малим мертвим об'ємом, компресійною гайкою та фільтром звичайного типу; б) з'єднання з нульовим мертвим об'ємом, зовнішньою гайкою та фільтром, ззапресованим у Кел Ф; в) з'єднання з малим мертвим об'ємом та розподільчим конусом.

Для досягнення мінімального мертвого об'єму кінцеві з'єднання колонок можуть бути двох типів: тип "а" має внутрішню або компресійну гайку; тип "б" – зовнішню натисну гайку (рис. 4.31). В залежності від типу вони мають різний мертвий об'єм. В з'єднаннях з малим мертвим об'ємом (рис. 4.31, а) торець капіляра впирається у спеціально оброблену площину накидної гайки колонки співосно з виконаним у ній отвором і фіксується у такому положенні різьбовим з'єднанням з ущільнюючою муфтою, котра обтискається на капілярі. Цей з'єднувач позначають аббревіатурою LDV (*Low dead volume*). На рис. 4.31, б показаний з'єднувач з нульовим мертвим об'ємом, чи ZDV (*Zero dead volume*). Капіляр у ньому проходить через наскрізне свердлення і впирається безпосередньо в площину пористого фільтра. В з'єднувачах типу LDV пористий фільтр колонки повністю притиснений до площини накидної гайки, потік розчинника поступає практично у одну точку фільтра. Накопичення забруднень у цій точці призводить до забивання фільтра та росту тиску, хоча решта поверхні фільтра залишається чистою. Практика роботи з кінцевими з'єднувачами типу ZDV показала, що вони також мають значні недоліки. По-перше, при багаторазовому монтажі-демонтажі колонки кінець капіляра зминає пористий фільтр у точці контакту, що призводить до зростання опору, а часом і повного припинення потоку через колонку; по-друге, у цих з'єднувачів досить значний об'єм, що погано проми-

вається, між стінками капіляра та накидної гайки колонки (від кінця останнього до ущільнюючої муфти).

Для оптимізації розподілу потоку й активного використання всього фільтра найсучасніші конструкції кінцевих з'єднувачів колонок мають розподільчий конус з кутом відносно площини 10° (рис. 4.31, в).

Заповнення колонок. Для відносно крупних сферичних часточок сорбентів (діаметром 30 мкм) застосовують *сухий метод заповнення*. Щоб шар адсорбенту був однорідним, колонку закривають знизу фільтром і поміщають в установку для заповнення. В процесі заповнення колонка переміщується ввєрх-вниз з необхідними частотою та амплітудою. Звєрху на колонку поміщають лійку, в яку з посудини з вузьким вихідним отвором подається сорбент. Окрім поздовжнього переміщення можна застосовувати вібрацію стінок колонки з підйомом вібратора по мірі заповнення колонки, але в цьому випадку спостєрігається накопичення часточок більшого розміру біля стінок колонки, і ефективність таких колонок через неоднорідність набивки нижче, ніж при вертикальних вібраціях. Також при сухому заповненні часточки сорбенту намагаються з'єднатися разом, утворюючи більш крупні агломерати в декілька десятків часточок, що в значній мірі обумовлене тертям часточок одна об одну, з утворенням поверхневих електричних зарядів. При цьому вірогідність агломерації значно зростає по мірі зменшення розмірів часточок.

Сорбенти з розміром часточок ≤ 10 мкм вводять у колонку у вигляді суспензії. Оскільки швидкість осадження маленьких часточок дуже мала, необхідно використовувати *динамічний метод заповнення*. Суспензію поміщають у резервуар, а елюент, що подається під тиском, протискає її в колонку. Швидкість потоку елюенту повинна бути більшою за швидкість осадження суспензії. Експериментально показано, що зручніше за все при заповненні користуватися U-подібною трубкою, одне коліно якої служить резервуаром для суспензії часточок сорбенту, а друге коліно під'єднане до колонки, що заповнюється, так, що суспензія поступає в неї знизу.

Рідке середовище для приготування суспензії підбирають таким чином, щоб його в'язкість була невелика і було зведене до мінімуму осідання часточок сорбенту під дією сили тяжіння. За енергійного перемішування часточки сорбенту можна однорідно розподілити в суспензійному середовищі, але припинення перемішування призводить до виникнення неоднорідності в системі під дією гравітаційних сил, причому часточки осідають зі швидкостями, пропорційними квадрату їх радіуса. Чим ширше діапазон розподілу часточок за розмірами, тим швидше початково однорідна суспензія буде ставати неоднорідною через розподіл часточок за розміром. Тому діапазон розподілу часточок повинен бути якнайвужчим. Разом з тим сегрегація зменшується, коли густина рідини наближується до густини часточок. Можна підібрати розчинники чи їх суміші, густина яких дорівнює густині часточок. Швидкість осадження часточок зменшується, коли зростає в'язкість рідини. Таким чином, використання в'язких рідин є альтернативою застосуванню розчинників із

збалансованою густиною. Головною трудностю у застосуванні рідин високої в'язкості є те, що опір колонки цьому буде високим і відповідно процес заповнення буде тривалим чи вимагатиме високого тиску.

Часточки діаметром 5 мкм осаджуються дуже повільно, для них рідко необхідні розчинники із спеціальними властивостями за густиною та в'язкістю. Часточки діаметром 10 мкм осаджуються у 4 рази швидше і зазвичай потребують підгонки густини та в'язкості рідкої фази для приготування колонок високої ефективності. До факторів, що визначають процес осадження, відносять і такі характеристики розчинника, як полярність та заряд. Суспензії нерідко стабілізують, додаючи водні розчини аміаку для попередження агломерації. У будь-якому разі розчинник повинен змочувати часточки сорбенту. Відносно полярні розчинники використовують для полярних сорбентів, а відносно неполярні розчинники – для неполярних сорбентів.

Отже для забезпечення якісного суспензійного заповнення колонки необхідно звести до мінімуму розподіл, якому піддається гомогенна суспензія, коли її подають у колонку, а також застосовувати достатній тиск, щоб зробити шар щільним. У табл. 4.3 наведені відносні густини та в'язкості деяких розчинників для приготування суспензій.

Таблиця 4.3.

Густини та в'язкості розчинників для приготування суспензій.

№	Розчинник	Густина, г/мл	В'язкість, МПа·с за 20°C
1.	Дийодметан	3,3	2,9
2.	Дибромметан	2,5	1,0
3.	Йодметан	2,3	0,5
4.	Чотирьоххлористий вуглець	1,6	1,0
5.	Хлороформ	1,5	0,6
6.	Бромметан	1,5	0,4
7.	Дихлорметан	1,3	0,4
8.	Метанол	0,8	0,6
9.	n-Гептан	0,7	0,4

Найбільш доцільною є концентрація часточок суспензії 10–30%. Розчинник для прокачування суспензії зазвичай відрізняється від розчинника, використаного для її приготування, але бажано, щоб вони були близькі за полярністю. Для утворення стійкої суспензії і дегазації розчинників нерідко застосовується ультразвуковий вплив на систему. За опублікованими даними, високоефективні колонки були одержані у діапазоні тисків 1–100 МПа, але, очевидно, дуже високий тиск не є необхідним. У всякому разі тиск, що використовується для заповнення колонки, повинен бути вищим, ніж робочий тиск колонки у хроматографі.

Термостат. Підвищення температури розділення поліпшує ефективність колонок у обернено-фазовій, іонообмінній та ексклюзійній хроматографії. Стабілізація температури також підвищує точність кількісних визначень, тому використання термостатів вельми бажане, а часом і обов'язкове.

У ВЕРХ частіше за все застосовують повітряні термостати з інтенсивною вентиляцією, у яких розміщені нагрівальні елементи, дозатор та колонки. Для безпечної роботи в термостаті встановлюють датчики, які реагують на появу пари органічних розчинників і вмикають світлову чи звукову сигналізацію з одночасним вимкненням насосної системи.

Для проведення більшості робіт у ВЕРХ цілком достатнім є діапазон термостатування до 100°C з точністю $\pm 0,2-1,0^\circ\text{C}$. В окремих випадках, а саме в ексклюзійній хроматографії деяких синтетичних полімерів, необхідне термостатування до 150°C.

Автоматизація експерименту. Удосконалення електронної техніки, мініатюризація логічних схем та розвиток персональних ЕОМ дозволили автоматизувати управління приладами, передавши багато функцій оператора електронному модулю управління (мікропроцесору 10). В його функції входить виконання заданих програм, які передбачають досягнення, підтримку та зміну з необхідною швидкістю у визначених інтервалах таких величин, як температура у термостаті колонок, тиск та витрата РФ, склад РФ (градієнтна елюція) тощо. У функції мікропроцесора може також входити управління колектором фракцій 9 у препаративній рідинній хроматографії.

4.4.2. Детектори для рідинної хроматографії

Детектори для ВЕРХ повинні фіксувати зміну яких-небудь властивостей розчинника, що виходить з колонки, пов'язану з присутністю в ньому речовин, які аналізуються. Це може бути зміна оптичних властивостей елюенту (в ІЧ-, УФ- чи видимій області), його показника заломлення, здатності до флуоресценції, окиснення чи відновлення, електропровідності, діелектричної проникності тощо.

Детектори діляться на селективні та універсальні. Селективні детектори здатні зафіксувати елюцію речовин, що найбільше цікавлять дослідника і володіють специфічними властивостями, на фоні багатьох інших компонентів, які такими властивостями не володіють. Ці детектори (флуоресцентний, електрохімічний та ін.) знаходять широке застосування в аналізі слідових кількостей лікарських препаратів у біологічних зразках, мікродомішок, біогенних амінів. Універсальні детектори повинні реагувати на елюцію будь-яких речовин незалежно від того, мають вони якісь специфічні властивості чи ні. Такі детектори знаходять широке застосування в органічній хімії, нафтохімії, фармацевтичній, хімічній, медичній промисловості.

Ідеальний детектор для ВЕРХ повинен мати високу чутливість і відклик на проходження речовини, він не повинен викликати розмивання хро-

матографічної зони речовини, що виходить з колонки, та її уширення. Зразок не повинен розкладатися, проходячи через детектор. Зміна температури, швидкості потоку і складу рухомої фази не повинна впливати на працездатність детектора. Відклик детектора на кількість речовини повинен бути лінійним, а лінійний діапазон – широким. Окрім того відклик детектора повинен з'являтися при проходженні через детектор будь-якої речовини. Детектор повинен бути простим та зручним у роботі та обслуговуванні.

Детектори, що використовуються у ВЕРХ далеко не в повній мірі володіють властивостями ідеального детектора. Таких детекторів, як ДІП чи ДТІП в газовій хроматографії, які за характеристиками наближаються до ідеальних, у ВЕРХ немає. Які ж характеристики детекторів потрібно брати до уваги, обираючи підходящий для тієї чи іншої роботи детектор? Ці характеристики слід поділити на ті, які пов'язані з самою конструкцією детектора, і на ті, які залежать від властивостей рухомої фази та компонентів суміші, що розділяється.

Кожен детектор характеризується певним шумом, який для різних детекторів виражається у різних одиницях. Його зазвичай визначають виробники детекторів в умовах, коли він мінімальний. Чим менший шум у детектора в порівнянні з іншими такого ж типу, тим він кращий. Різниця в шумі у різних детекторів одного типу може відрізнятись на порядок і навіть більше.

Інша важлива величина – це дрейф нульової лінії, який визначає зміщення нульової лінії в процесі роботи детектора за певний проміжок часу після прогріву. Ця величина також може мати різницю в детекторах одного типу більшу ніж на порядок.

Місткість кювети чи комірки детектора є фактором, що нарівні з її геометрією (розмиваючою чи нерозмиваючою) визначає, наскільки можуть бути розмиті піки, які попадають в неї з колонки. Місткість кювети повинна бути не більшою 0,1 об'єму першого піка, який становить інтерес для дослідника (наприклад, якщо перший такий пік виходить в об'ємі 30 мкл, місткість кювети не повинна перевищувати 3 мкл). Це особливо суттєво для експрес-аналізів методом ВЕРХ, які виконуються на коротких колонках діаметром не більше 2 мм, заповнених сорбентом з діаметром часточок 3 мкм.

Лінійний динамічний діапазон, який характеризує діапазон концентрацій, в якому відклик детектора пропорційний концентрації, повинен бути широким (бажано більше ніж 10^5), для того, щоб з одного аналізу можна було визначити як основні компоненти, так і домішки, які містяться в слідових кількостях.

Нарешті, якщо детектор працює у градієнтному режимі чи в умовах, що не виключають деякої зміни оточуючої температури, дуже велике значення має нечутливість детектора до флуктуацій температури, швидкості потоку та зміни складу РФ і стабільність його відклику незалежно від зміни цих умов.

Найбільш поширеними детекторами у рідинній хроматографії є оптичні. Оптичні детектори можна розділити на наступні класи:

абсорбційні детектори, які працюють в ультрафіолетовій області спектру (190–380 нм) – УФД;

абсорбційні детектори для видимої області спектру (380–800 нм) – Вид-Д;

інфрачервоні детектори (800–5000 нм) – ІЧД;

рефрактометричні різних типів – РМД;

емісійні флуориметричні різних конструкцій – ФМД;

хемілюмінесцентні – ХЛД.

УФ-детектори. Найчастіше в рідинній хроматографії використовуються фотометричні детектори, що ґрунтуються на вимірюванні поглинання в ультрафіолетовій чи видимій області спектру, оскільки більшість хімічних сполук мають досить інтенсивні смуги поглинання в діапазоні довжин хвиль 200–800 нм. Наявність підходящих розчинників, прозорих у цьому діапазоні довжин хвиль, робить фотометричні детектори особливо придатними для градієнтної елюції.

Фотометричні детектори відрізняються досить високою чутливістю до речовин, що поглинають світло, мають широкий лінійний динамічний діапазон (до 10^5), малий робочий об'єм комірок (до 1 мкл), невелике позаколоночне розмивання хроматографічних піків і високу відтворюваність показань. Вони недеструктивні, відносно нечутливі до коливань потоку РФ та змін температури. Ці детектори зручні у роботі і забезпечують можливість вибору довжини хвилі.

Чутливість сучасних УФД може сягати 0,001 одиниць оптичної густини на всю шкалу за 1% шуму. За такої високої чутливості можна зафіксувати незначні кількості (декілька нанограмів) речовин, що досить слабо абсорбують в УФ-області.

Фотометричні детектори діляться на детектори з фіксованою довжиною хвилі (УФД); детектори із змінною за допомогою фільтрів довжиною хвилі чи фільтрові фотометри (ФУФД); спектрофотометричні детектори з детектуванням у певній області довжин хвиль (СФД). Найбільш прості та дешеві УФД широко застосовуються у рідинних хроматографах, призначених для масових рутинних аналізів. При використанні ртутної лампи низького тиску, що має високу стабільність та великий строк служби (більше 5000 год.), детектування проводиться на довжині хвилі 254 нм, якій відповідає 90% енергії випромінювання. На цій довжині хвилі високе поглинання мають багато органічних сполук, таких як ароматичні, гетероциклічні, карбонільні тощо.

УФ-світло від джерела проходить через проточну комірку, в яку з хроматографічної колонки поступає потік рухомої фази. Найчастіше застосовують комірки, які мають наступні розміри: довжина оптичного шляху 10 мм, діаметр світлового каналу 1 мм, робочий об'єм близько 8 мкл. Такі комірки

підходять головним чином для аналітичних колонок внутрішнім діаметром 4–6 мм, заповнених сорбентом з розміром часточок близько 5 мкм. Як уже відмічалось вище, робочий об'єм комірки є одним із найважливіших її параметрів. Наприклад, комірка об'ємом 8–10 мкл може призвести до додаткового розмивання піка на 30-50 мкл і може виявитися непридатною для піків шириною менше 100 мкл. Зменшення об'єму комірки можна досягти двома шляхами: зменшенням довжини оптичного шляху, що призводить до падіння чутливості детектора, та зменшенням діаметра каналу комірки, яке викликає падіння інтенсивності світла, що проходить через комірку, й збільшенням рівня флуктуаційних шумів. Обидва ці ефекти збільшують межу детектування. Важливо також, щоб потік елюенту в комірці був ламінарним, а світло не розсіювалося. Неоднорідність структури потоку та розсіювання зменшують інтенсивність світла.

Для компенсації фону оптичні детектори часто мають дві комірки: робочу та порівняльну. За двоканального детектування користуються наступними способами підключення порівняльних комірок: статичним – при заповненні порівняльної комірки чистим розчинником і динамічним: шляхом розділення потоку РФ від насоса на дві частини і пропускання однієї з них через робочу, а другої – через порівняльну колонку та порівняльну комірку; з використанням додаткового насоса низького тиску для прокачування через комірку тієї ж РФ; шляхом включення порівняльної комірки між посудиною з РФ і насосом у зоні всмоктування, а робочої комірки – після хроматографічної комірки.

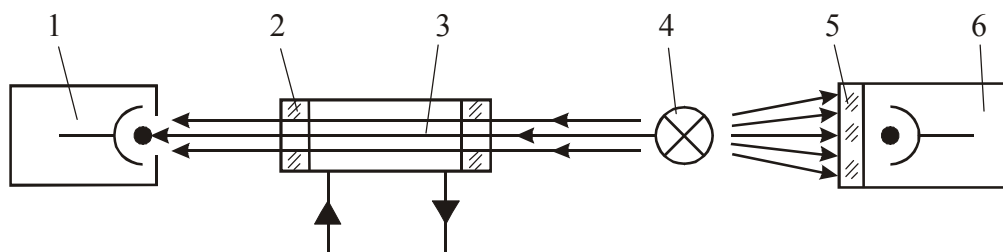


Рис. 4.32. Оптична схема УФ-детектора фірми "Дюпон".

Принципова схема монохроматичного УФД фірми "Дюпон" наведена на рис. 4.32. УФ-світло довжиною хвилі 254 нм від ртутної лампи 4 низького тиску проходить через проточну кювету 3, обмежену кварцовими вікнами 2, та попадає на фотомножник 1. Світло також через нейтральний фільтр 5 проходить на порівняльний фотомножник 6. Сигнали з датчиків 1 та 6 поступають на логарифмічний підсилювач, який видає сигнал в залежності від концентрації проби. Сигнал записується реєстратором.

Одним з основних питань конструювання фотометричних детекторів є забезпечення можливості фотометрування у достатньо широкому діапазоні довжин хвиль. Це необхідно не тільки для отримання максимальної чутливості на довжині хвилі, що відповідає ширині смуги максимального поглинання

речовини, але й для значного зниження чутливості, що полегшує лінійне детектування високих концентрацій у випадку препаративної хроматографії.

Спектральний діапазон та ступінь його розділення на піддіапазони залежать від спектральної характеристики джерела випромінювання і від способу виділення необхідної спектральної смуги, що здійснюється чи до виміральної комірки, чи після неї. Деякі джерела мають лінійчатий спектр (наприклад, ртутна лампа – 254, 303, 313, 365, 404, 436, 546 нм), інші – безперервний спектр (наприклад, дейтерієва лампа – 190–600 нм). Інтенсивність їх випромінювання в межах робочого діапазону приблизно однакова. Необхідна спектральна смуга може бути виділена одним з наступних методів: за допомогою дифракційних ґраток, що мають 1000–3000 штрихів на 1 мм, чи застосуванням інтерференційних фільтрів із заданою шириною спектральної смуги. У обох випадках можна отримати спектральну напівширину від 1–2 нм до 10–20 нм.

У рідинній хроматографії в залежності від способу дискретизації спектрального діапазону розрізняють спектрофотометри та фільтрові фотометри. Останні мають особливо велике значення для дешевих приладів масового аналізу, де необхідно забезпечити детектування на декількох довжинах хвиль.

Характерною особливістю фільтрових УФД є використання в них джерел лінійчатого спектру. Окрім ртутної лампи застосовують також цинкову та кадмієву лампи з лініями на 214 та 229 нм відповідно, а також перетворювачі довжини хвилі випромінювання на 280–290 нм та інші довжини хвиль, відсутні у спектрі ртуті.

Спектрофотометричні детектори (СФД), що забезпечують можливість багатохвильового детектування, є найдорожчими з усього ряду. Принцип їх дії розглянемо на прикладі СФД хроматографа ХЖ–1307 (Росія). Детектор складається з оптико-механічного блоку, детекторного блоку та блоку живлення джерела випромінювання. Діапазон довжин хвиль детектора 200–600 нм. Об'єм змінних комірок 4, 6 та 16 мкл. Діапазон вимірювання оптичної густини від 0,04 до 0,64. Елементи оптичної схеми оптико-механічного блоку змонтовані на жорсткій основі, на якій також розміщений механізм приводу дифракційної ґратки.

Оптична схема СФД наведена на рис. 4.33. Випромінювання від джерела світла 2 дзеркалами 5 та 6 направляється на вхідну щілину 3 монохроматора. Еліптичним дзеркалом 5 світло відображається на площину вхідної щілини, розміщеної у фокусі дзеркала 1. Колективом 4 і дзеркалом 1 світло від дзеркала 5 відображається на дифракційну ґратку 16, яка розкладає випромінювання лампи у спектр. Паралельний пучок променів, відбитий від ґратки, знову попадає на дзеркало 1 і фокусується на площину вихідної щілини монохроматора. Поворотом ґратки навкруг осі на вихідну щілину направляється випромінювання різних довжин хвиль. З допомогою дзеркала 1, колектива 14 і діафрагми 13 дифракційна ґратка відображає світло на модулююче дзеркало

12, котре коливається поблизу вертикальної осі, направляючи монохроматичний пучок світла то у вимірювальну, то у порівняльну комірку 11 СФД. Випромінювання після проходження комірок направляється дзеркалом 10 на катод фотомножника 8. Увігнуте дзеркало 7 має сектор із змінним коефіцієнтом відображення і обладнане механізмом повороту навкруг осі, що забезпечує можливість регулювання оптичного нуля.

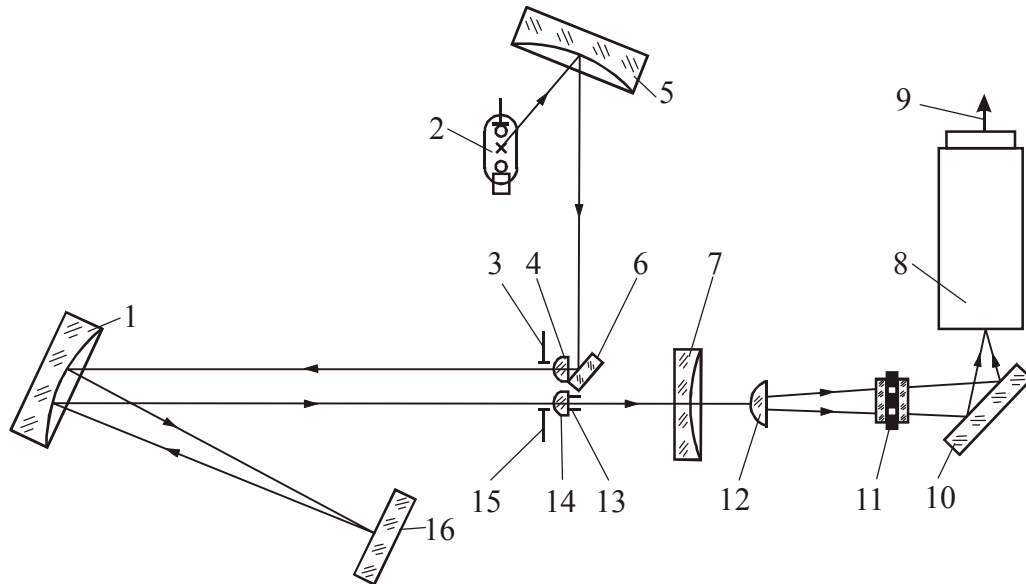


Рис. 4.33. Оптична схема спектрофотометричного детектора: 1,5 – параболічні дзеркала; 2 – джерело УФ-випромінювання; 3 – входна щілина монохроматора; 4,14 – колектив; 6,10 – дзеркало; 7 – увігнуте дзеркало; 8 – фотомножник; 9 – коаксiальний кабель; 11 – робоча та порівняльна проточні комірки; 12 – модулююче дзеркало; 13 – діафрагма; 15 – вихідна щілина монохроматора; 16 – дифракційна ґратка.

Сигнал 9 з фотомножника попадає на детекторний блок. Блок живлення необхідний для пуску та стабілізації струму джерела випромінювання (дейтерієва чи ксенонова лампи).

Одним з перспективних напрямів розвитку фотометричних детекторів є застосування фотодіодної матриці. Оптична схема фотодіодних УФ-детекторів наведена на рис. 4.34. У таких детекторах безперервне випромінювання лампи 1 через діафрагму 2 і конденсор 3 проходить через проточну робочу комірку 4 і попадає на дифракційну ґратку 5. Промінь відхиляється і фокусується на площині, де розміщується фотодіод, який механічно переміщується та сканує спектр по мірі руху вздовж нього (рис. 4.34, а), чи фотодіодна матриця (рис. 4.34, б). Таким чином спектр відображається на матрицю, яка складається із 200-250 елементарних фотодіодів і видає інформацію про поглинання світла одразу у всьому діапазоні довжин хвиль з дискретністю 2-5 нм. Постійна часу системи із 200 фотодіодами повинна бути не більше 40 мс. При реєстрації спектру у діапазоні довжин хвиль 200–600 нм такий детектор може записати до 200 хроматограм. Детектори з фотодіодною матрицею

при обробці сигналів на комп'ютері можуть знайти широке застосування для аналізу складних сумішей, ідентифікації компонентів за їх спектрами, розділення неподілених піків та одночасного детектування на декількох довжинах хвиль.

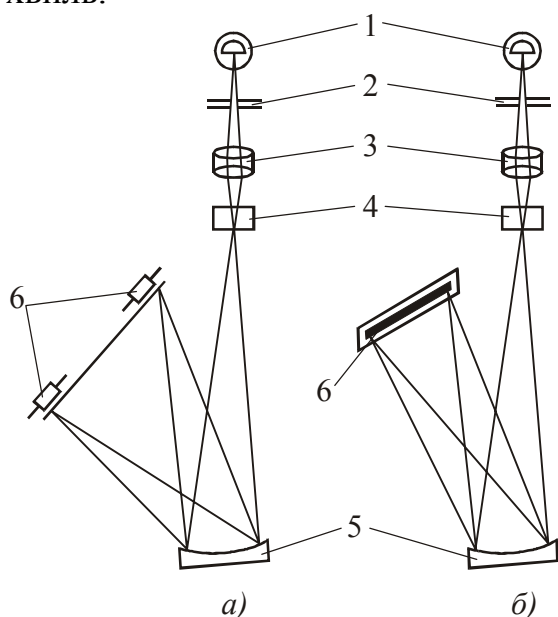


Рис. 4.34. Фотодіодні УФ-детектори: а) з механічним рухомих фотодіодом; б) з фотодіодною матрицею; 1) джерело УФ-випромінювання; 2 – діафрагма; 3 - конденсор; 4 – проточна робоча комірка; 5 - дифракційна ґратка; 6 – механічний рухомий фотодіод чи матриця.

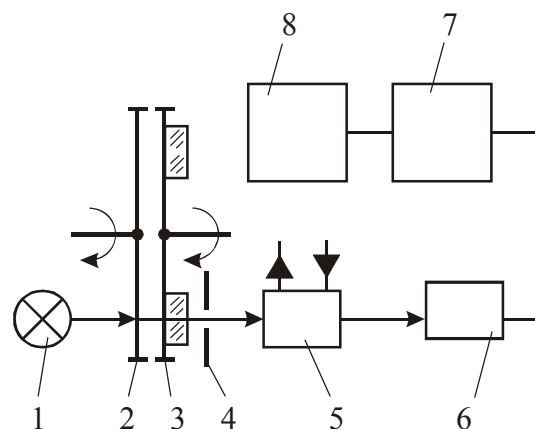


Рис. 4.35. ІЧ-детектор сучасного рідинного хроматографа: 1 – джерело випромінювання; 2 – обтюратор; 3 – диск з фільтрами; 4 – діафрагма; 5 – вимірювальна комірка; 6 – термоелектричний детектор; 7 – підсилювач; 8 – реєстратор.

ІЧ-детектори також відносяться до фотометричних детекторів. Деякі функціональні групи органічних сполук мають характеристичні частоти у ІЧ-спектрах цих сполук. Тому ІЧД може бути застосований для ідентифікації органічних сполук. Однією з основних умов роботи ІЧД є прозорість РФ у ІЧ-області спектру. Найбільш підходящими розчинниками є CCl_4 , CHCl_3 , CS_2 , однак вони дуже рідко застосовуються у практиці РХ.

Абсорбція ІЧ-світла може застосовуватися як для селективного, так і неселективного детектування. Якщо раніше ці детектори застосовувалися головним чином у ексклюзивній хроматографії з колонками великого діаметра, то в наш час вони усе ширше впроваджуються у ВЕРХ. Схема сучасного ІЧД наведена на рис. 4.35. Світло від джерела 1 проходить через обтюратор 2 та диск 3 з закріпленими на ньому трьома інтерференційними фільтрами у діапазонах довжин хвиль 2,5–4,5; 4,5–8; 8–14,5 мкм. Диск крутиться, і будь-який з фільтрів легко може бути встановлений на шляху променя світла. Монохроматичне ІЧ-світло після фільтра проходить через діафрагму 4, а потім через комірку детектора 5, котра зазвичай має довжину оптичного шляху близько 1 мм. Світло, яке пройшло через комірку, попадає на термоелектричний детектор 6, сигнал якого подається на підсилювач 7 і далі на реєстратор 8.

До всіх сполук, що мають одні й ті ж функціональні групи, ІЧД має приблизно однакову чутливість. У зв'язку з незалежністю показань ІЧД від молекулярної маси сполук, що детектуються, він має значні переваги в порівнянні, наприклад, із рефрактометричним детектором (див. нижче).

Детектор стабільно працює за підвищених температур (близько 150°C) комірки. В оптимальних умовах поріг детектування ІЧД складає близько 1 мкг речовини з молекулярною масою 300, яка містить прості зв'язки С–Н, на довжині хвилі 3,4 мкм. Якщо у молекулі органічної сполуки є функціональні групи, що абсорбують ІЧ-випромінювання сильніше, ніж зв'язки С–Н, то чутливість детектора підвищується, однак, в середньому вона не перевищує чутливості рефрактометричного детектора.

Рефрактометричні детектори. Диференційний рефрактометр безперервно реєструє зміну показника заломлення елюату на виході з колонки. Головною перевагою такого детектора є його універсальність, оскільки при правильному виборі складу РФ він може детектувати будь-які речовини. Тому він займає друге місце (після УФ-детектора) за частотою використання. До інших переваг рефрактометричного детектора відносяться можливість роботи з будь-якими розчинниками у широкому інтервалі швидкості потоку, надійність та зручність у експлуатації. Деякі моделі детекторів можуть працювати за температур до 150°C, що є виключно важливим для ексклюзивної хроматографії ряду синтетичних полімерів.

Рефрактометр являє собою недеструктивний концентраційний детектор середньої чутливості. Остання визначається різницею показників заломлення елюента і аналітів і часто може бути підвищена за рахунок правильного підбору РФ. В оптимальних умовах поріг виявлення для РМД складає $5 \cdot 10^{-7}$ г/мл. Основні недоліки РМД – неможливість використання у градієнтному режимі елюції та необхідність ретельної стабілізації температури. Для роботи на максимальній чутливості необхідно підтримувати температуру РФ в обох комірках кювети з точністю 10^{-3} – 10^{-4} °C, що важко навіть при розміщенні кювети у металевому блоці з великою теплоємністю і використанні ефективних теплообмінників. Останні, в свою чергу, збільшують мертвий об'єм між колонкою та кюветою детектора, що призводить до додаткового розмивання хроматографічних зон та зниження ефективності розділення. Рефрактометри вельми чутливі до пульсацій потоку, тому при роботі з РМД необхідно застосовувати демпфери.

Фірмами-виробниками випускаються рефрактометричні детектори трьох типів, які відрізняються принципами вимірювання.

Найбільш поширеними є *рефрактометри оптичного відхилення*. Принцип їх дії оснований на тому, що при проходженні променя світла через кювету, заповнену двома рідинами з різними показниками заломлення, промінь відхиляється на кут, пропорційний різниці цих показників.

Принципова схема рефрактометра показана на рис. 4.36. Світло від лампи 1 проходить через маску 2, збирається в паралельний пучок лінзою 3 і

попадає в кювету. Кювета являє собою дві комірки у вигляді призми із спільною гранню; у вимірювальну комірку 4 подається РФ з колонки, а порівняльна комірка 5 заповнена чистою РФ. За зміни показника заломлення у вимірювальній комірці промінь світла відхиляється від попереднього напрямку, відбивається дзеркалом 6 назад у кювету, знову відхиляється і через лінзу 3 фокусується на фотоопорі 7. Останній виробляє пропорційний положенню променя світла електричний сигнал, який підсилюється електронним підсилювачем 8. Спеціальна скляна пластина 9 служить для встановлення оптичного нуля.

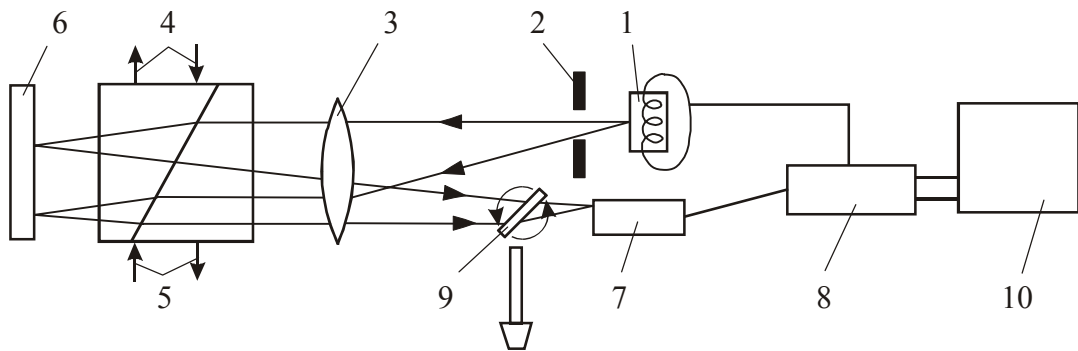


Рис. 4.36. Схема рефрактометра оптичного відхилення: 1 – лампа; 2 – маска; 3 – лінза; 4 – робоча кювета; 5 – порівняльна кювета; 6 – дзеркало; 7 – фотоопір; 8 – підсилювач; 9 – пластина встановлення оптичного нуля; 10 – реєстратор.

Рефрактометри оптичного відхилення можуть працювати з будь-якими розчинниками і мають широкий лінійний діапазон. Місткість кювети зазвичай дорівнює 10 мкл а поріг чутливості складає $5 \cdot 10^{-8} - 2 \cdot 10^{-7}$ одиниць рефракції.

Дія *рефрактометра Френеля* ґрунтується на законі Френеля, який говорить, що кількість світла, відбитого від поверхні розподілу двох речовин (рідини й скла), пропорційна різниці показників заломлення цих речовин і куту падіння світла на поверхню розподілу. Для одержання максимальної чутливості кут відбиття повинен бути близьким до критичного.

Оптична схема рефрактометра Френеля показана на рис. 4.37. Основою конструкції є скляна призма 2 з кутом при вершині 90° , основа якої є верхньою стінкою кювет. Вимірювальна 3 та порівняльна 4 щілоподібні кювети утворені отворами спеціальної форми у тонкій прокладці із фторопласту, затиснутій між основою призми 2 та дзеркальною пластиною з неіржавіючої сталі 5 (нижня стінка кювет), яка одночасно є теплообмінником. Світло від джерела 8 проходить через щілину, конденсор і відхиляючу пластину 7, розділяється на два паралельних пучка, які зфокусовані на поверхні розподілу скла та рідини в робочій та порівняльній кюветах. Світловий потік в кюветах проходить через тонкий шар рідини і відбивається від пластини 5. Відбите світло фокусується лінзами на вимірювальний та порівняльний фотоопори

6. Різницю сигналів підсилює електронний підсилювач та реєструє самописець. Джерело світла разом з оптичною системою формування двох паралельних пучків світла змонтовані на окремій оптичній платформі, яку можна повертати для зміни кута падіння та підтримування кута відбиття близьким до критичного.

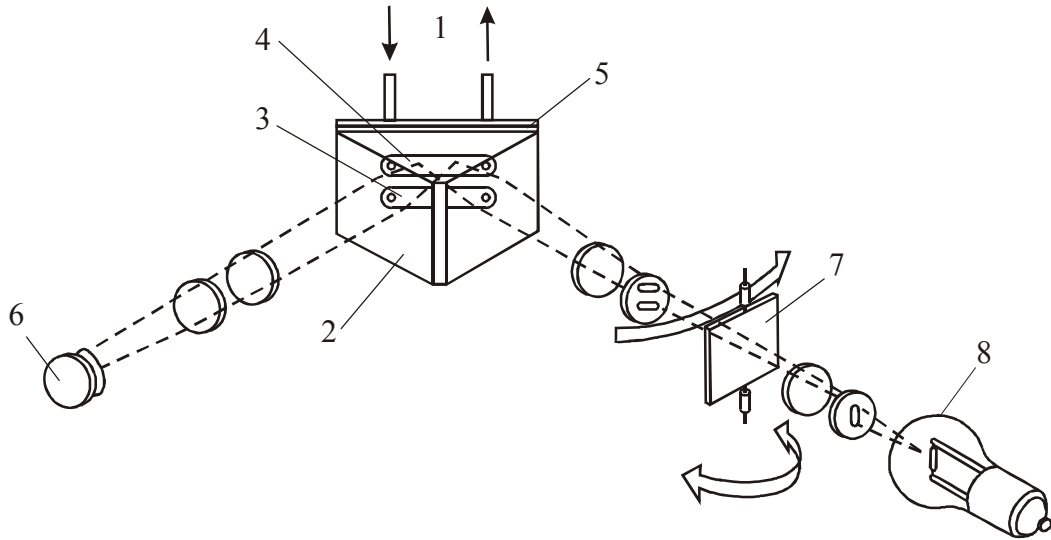


Рис. 4.37. Схема диференційного рефрактометра фірми “Дюпон”: 1 – зразок; 2 - призма; 3 – порівняльна комірка; 4 – вимірювальна комірка; 5 – дзеркальна стальна пластина; 6 – здвоєний фотоопір; 7 - відхиляюча пластина; 8 – джерело світла.

Головною перевагою рефрактометра Френеля є малий об’єм кювети (3-5 мкл), що дозволяє застосовувати його у швидкістному аналізі методом ВЕРХ. Основні недоліки – необхідність використання двох призм (1,31-1,44 та 1,40-1,55) для перекривання всього необхідного діапазону показників заломлення розчинників і дуже високі вимоги до чистоти кювет. Цей детектор найбільш чутливий до пульсацій потоку і має менший діапазон лінійності, ніж рефрактометр оптичного відхилення, а поріг чутливості – 10^{-7} одиниць рефракції.

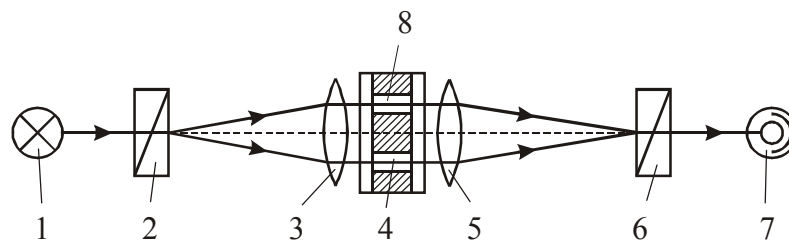


Рис. 4.38. Оптична схема рефрактометричного детектора: 1 – джерело світла; 2,6 – ділитель; 3,5 – лінза; 4 – вимірювальна комірка; 7 – чутливий елемент; 8 – порівняльна комірка.

У рефрактометричних детекторах третього типу використовується *інтерферометричний* принцип зсуву. Такий рефрактометр відносно недавно був розроблений фірмою “Оптилаб” (Швеція) і випускається тільки розроб-

ником. Оптична схема детектора наведена на рис. 4.38. Промені світла від джерела 1 видимої області спектру розділяються ділителем 2 на дві частини, фокусуються лінзою 3 і проходять через робочу 4 та порівняльну 8 комірки об'ємом 5 мкл. Промені світла після цього фокусуються за допомогою лінзи 5 і ділителя 6 і попадають на чутливий елемент 7.

Різницю показників заломлення робочого та порівняльного потоків елюенту приводять до різниці в довжині оптичного шляху, яка вимірюється інтерферометричним РМД як зміна довжин хвиль світла. За даними фірми у цього детектора дуже висока лінійність сигналу а чутливість на порядок вища, ніж у інших рефрактометрів. Однак для одержання стабільної нульової лінії необхідне дуже ретельне термостатування усієї хроматографічної системи, і повністю реалізувати його високу чутливість практично не вдається.

Інші детектуючі системи. У біології, медицині, фармакології, при аналізі харчових продуктів та контролі забруднень навколишнього середовища застосовують детектування за флуоресценцією. Флуоресцентні властивості, тобто здатність випромінювати світло (у видимій області спектру) під дією ультрафіолетового опромінення, мають багато біологічно-активних речовин: лікарські препарати, вітаміни, стероїди. Барвники, сполуки із супр'яженими подвійними зв'язками, в тому числі поліядерні ароматичні вуглеводні також можна детектувати за допомогою флуорометричного детектора, при цьому чутливість детектування досить висока. Інтенсивність флуоресцентного випромінювання залежить від інтенсивності збуджуючого випромінювання та квантового виходу процесу збудження. Тому для підвищення чутливості слід використовувати досить потужні джерела світла, наприклад газорозрядні лампи чи лазери.

Окрім детекторів, описаних чи згаданих вище, у ВЕРХ застосовують й інші прилади: електрохімічний, мас-спектрометричний, транспортний з полуменево-іонізаційним детектуванням, радіоактивний, за діелектричною проникністю, кулонометричний тощо. Одні з них мають високу селективність чи чутливість, інші дають важливу якісну інформацію. Однак з тих чи інших причин детектори, які застосовуються у наш час, далекі від досконалості, особливо з точки зору використання їх в автоматичних хроматографах. У зв'язку з цим досконалим слід вважати високочутливий детектор (з порогом детектування $10^{-6}\%$), що має високу лінійність (у межах 100% концентрації), робота якого не залежить від параметрів експерименту (температури, витрати елюенту, тиску, напруги, струму тощо). Такий "ідеальний" детектор поки що не створений. Розвиток мікроелектроніки та мікропроцесорної техніки, широке впровадження обчислювальних інтеграторів та ЕОМ, автоматизація роботи детекторів і хроматографів в цілому, розвиток мікроколоночної та капілярної хроматографії, бурхливий розвиток таких галузей науки, як генетика, біохімія, клінічна хімія, мікробіологія та фармакологія, створюють передумови для подальшого розвитку та вдосконалення детектуючих систем у хроматографії.

Автоматизація експерименту. Розвиток та вдосконалення електронної техніки, мініатюризація логічних схем дозволили автоматизувати управління приладами і передати численні функції оператора модулю управління (мікропроцесору 10). В його функції входить виконання завданих програм, які передбачають досягнення, підтримку та зміну з завданою швидкістю та у завданих межах таких параметрів хроматографічної системи, як температура в термостаті колонок, тиск та витрата рухомої фази, склад рухомої фази за градієнтної елюції тощо. У функції мікропроцесора може також входити управління колектором фракцій 9 у препаративній ВЕРХ.

4.4.3. Вплив різних факторів на хроматографічне розділення

Температура колонок. Підвищення температури збільшує розчинність зразка в рухомій фазі та швидкість масопередачі, що призводить до підвищення ефективності колонки. Окрім того, зменшення в'язкості РФ з підвищенням температури дає можливість знизити тиск на вході в хроматографічну колонку та скоротити час хроматографування за рахунок збільшення її об'ємної витрати. Рекомендується підвищувати температуру у всіх тих випадках, коли це не призводить до деструкції зразка чи набивки колонки. Для іонообмінної та розподільчої хроматографії максимальна рекомендована температура 75°C, а для хроматографії полімерів – 130°C. Однак, працюючи за підвищених температур, слід мати на увазі, що з ростом температури знижується селективність розділення ізомерних сполук.

Рухома фаза. ВЕРХ пред'являє дуже високі вимоги до чистоти розчинників, що застосовуються як компоненти РФ, тому очистка хімічними методами та ректифікація обов'язкова. Небажано застосовувати як елюенти рідини з високою в'язкістю, оскільки підвищення в'язкості РФ призводить до зростання гідравлічного опору, зменшення витрати, необхідності підвищення тиску.

Вибір рухомої фази проводиться за тими ж принципами, що й для рідинної хроматографії за низького тиску, тобто у випадку полярної НФ збільшення полярності РФ прискорює процес хроматографування, а у випадку неполярної НФ (хроматографія з оберненою фазою) ефект зворотній.

При виборі елюенту необхідно також враховувати тип детектора. Так, для роботи з рефрактометром необхідно знати коефіцієнти заломлення розчинників, а для роботи з УФ-детектором – межу прозорості в ультрафіолетовому діапазоні спектру (табл. 5.1).

Носії та нерухомі фази. Застосування високого тиску вимагає від нерухомих фаз перш за все високої механічної міцності. Бажано мати часточки НФ сферичної форми, яка полегшує рівномірність пакування колонки. Високі вимоги до однорідності часточок за розміром та контрольована пористість були стимулом до створення штучних сорбентів на основі силікагелю та скла з комплексом бажаних властивостей.

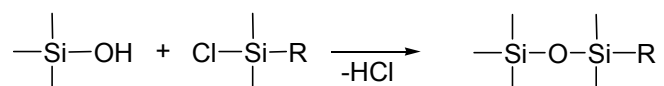
Пористість носія збільшує його питому поверхню, тим самим збільшуючи ємність нерухомої фази. Однак збільшення глибини пор зменшує швидкість масообміну. Обмежити глибину пор можна двома шляхами: зменшенням розміру часточок до 3-5 мкм і створенням часточок з контрольованою поверхневою пористістю (див. стор. 33).

У ситовій (ексклюзивній) хроматографії, навпаки, використовується властивість молекул затримуватися у порах сорбенту. Замість механічно нетривких декстранів та полістиролдивілбензолних гелів для застосування у ВЕРХ розроблені та виробляються нерухомі фази на основі пористого скла та силікагелю з розміром пор 10-250 мкм, які використовуються для розділення за величиною молекулярної маси в інтервалі $5 \cdot 10^2 - 10^6$ а.о.м. (“Біо-Глас”, “CPG-10”, “Порасіл”, “Зорбакс-PSM” тощо).

Для адсорбційної хроматографії часом застосовують носії з контрольованою поверхневою пористістю (“Корасіл II” “Меркосорб”) однак вони мають малу питому поверхню ($10 - 14 \text{ м}^2/\text{г}$), тому частіше застосовуються адсорбенти з малим розміром зерна (“Порасіл”, “Ліхросорб”, “Зорбакс Сіл” тощо), питома поверхня яких сягає $400 \text{ м}^2/\text{г}$.

Лише на самому початку становлення ВЕРХ використовували тверді носії з нанесеною на них нерухомою рідкою фазою, як у елюційному варіанті за низького тиску. В подальшому необхідність застосування високих лінійних швидкостей елюції, стандартизація та, головним чином, забезпечення *відтворюваності* результатів призвела до розробки, освоєння і, в наш час, повного переходу на носії, хімічно модифіковані нерухомою рідкою фазою.

Обробкою поверхні силікагелю, що має вільні гідроксильні групи, хлорсиланами, які містять біля атома кремнію алкільні або заміщені алкільні радикали, вдається одержати на поверхні носія практично мономолекулярний шар із заданими властивостями:



Таким чином поверхню силікагелю найчастіше хімічно модифікують наступними радикалами: октил (C_8), октадецил (C_{18} або ОДС), алкілнітрил (CN), алкіламін (NH_2), аліфатичний етер, алкілгідроксид.

Такий спосіб модифікації забезпечує стійкість до гідролізу навіть при застосуванні рухомих ваз, які містять воду у межах рН від 1 до 10. Хроматографія на носіях з полярними групами (ОН, NH_2), де рухомими фазами є неполярні чи малополярні розчинники та їх суміші, схожа на адсорбційну хроматографію на полярних адсорбентах, але має ту перевагу, що виключає необоротну сорбцію компонентів суміші на колонці і дозволяє швидко змінювати склад рухомої фази.

Нерухомі фази, хімічно модифіковані неполярними вуглеводневими залишками (октил- чи октадецилсилільні) застосовують виключно для так званої обернено-фазової хроматографії, у якій елюентами є суміші метанолу, ацетонітрилу чи тетрагідрофурану з водою.

Нерухомі фази з проміжною полярністю (нітрильна та етерна) можуть застосовуватися як для нормально- так і для обернено-фазової хроматографії.

Таким самим чином силікагелі хімічно модифікують і більш полярними групами, одержуючи фази для іонообмінної хроматографії.

Переваги хімічно модифікованих нерухомих фаз дозволяють, користуючись невеликим набором колонок та широко змінюючи характер і склад РФ (градієнтна елюція), розділяти з високою ефективністю найрізноманітніші суміші. Практика показує, що без погіршення властивостей колонки з такими фазами можуть працювати тривалий час (1 – 5 років).

4.4.4. Области застосування ВЕРХ

Підбір умов для ВЕРХ досить трудомісткий, тому вона рідко застосовується для виконання рутинного якісного хроматографічного аналізу невідомих сумішей. Значно ширше ВЕРХ застосовується для кількісного аналізу, особливо сумішей біологічного походження, лікарських препаратів та сполук, нетривких при підвищених температурах. Слід враховувати, що детектори, які застосовуються у ВЕРХ, реагують на різні речовини суттєво різним чином і площі їх піків за величиною часто не відповідають відносному вмісту у суміші. Побудова калібрувальних кривих чи знаходження калібрувальних коефіцієнтів у цьому випадку обов'язкове.

Діапазон застосування ВЕРХ, дякуючи можливості виконувати адсорбційну, розподільчу, іонообмінну чи ексклюзивну хроматографію у м'яких умовах, надзвичайно широкий – це аналіз хімічних засобів захисту рослин, речовин медичного та біологічного призначення, розділення амінокислот та біополімерів, дослідження розподілу полімерів за молекулярною масою тощо. Для прикладу розглянемо застосування ВЕРХ для аналізу мікродомішок. Термін “аналіз мікродомішок” передбачає виявлення та розділення низькоконцентрованого компонента зразка (концентрація нижче, ніж, приблизно, 100 частин на мільйон). До такої категорії можна віднести наступні аналізи: аналіз домішок у технічних матеріалах; аналіз забруднювачів атмосфери, які переносяться повітряним шляхом; аналіз мікродомішок у масі води; аналіз низькоконцентрованих речовин у масі твердого матеріалу (наприклад, аналіз залишків отрутохімікатів у продуктах сільського господарства та харчових продуктах); аналіз вмісту лікарських препаратів та їх метаболітів у біологічних рідинах.

Практика показує, що методами сучасної ВЕРХ у найбільш сприятливих умовах можна досягти порогу виявлення порядку 1 частини на мільярд. Окрім того, як правило, ступінь підготовки зразка (тобто очистки та одержання похідних), необхідний для ВЕРХ, набагато менший, ніж для газової хроматографії. Сам характер такого аналізу припускає, що вкрай неймовірна можливість безпосереднього введення зразка у рідинний хроматограф, оскі-

льки речовина, яка нас цікавить, занадто розведена та (або) у надлишку містяться інші речовини, які заважають аналізу.

Якщо нас цікавить аналіз домішок у технічних матеріалах, то необхідно враховувати, що розділення компонентів зразка рідинною хроматографією може бути забезпечене лише тоді, коли вони присутні у приблизно у рівних концентраціях. Як показує досвід роботи в області рідинної хроматографії, непропорційність концентрації одного компонента призводить до недостатнього розділення чи до неможливості необхідного виявлення, оскільки для того, щоб нанести необхідну для виявлення кількість низькоконцентрованого компонента, приходиться надто перевантажувати колонку основним компонентом. У таких випадках надійним підходом є метод очистки на препаративній хроматографічній колонці. Рідину, зібрану після колонки, випаровують до одержання сухої маси, після чого розчиняють у необхідному об'ємі рідини. Цей розчин можна проаналізувати за допомогою аналітичної хроматографічної системи.

5. ДОДАТОК

Таблиця 5.1.

Елюотропний ряд для полярних адсорбентів

Розчинник	$\varepsilon_{\text{Al}_2\text{O}_3}^0$	В'язкість за 20°C, сПз	Коеф. залом- лення, n_D	Межа пропус- кання УФ, нм	Темпера- тура кипіння, °C
1	2	3	4	5	6
Фторалкани	-0,25	-	1,25	-	-
<i>n</i> -Пентан	0,00	0,23	1,358	210	36,1
Петролейний ефір	0,01	0,30	-	210	30-60
<i>n</i> -Гептан	0,01	0,41	1,388	210	98,4
Ізооктан	0,01	0,54	1,404	210	118
<i>n</i> -Декан	0,01	0,92	1,412	210	174
Циклогексан	0,04	1,00	1,427	210	80,7
Циклопентан	0,05	0,47	1,406	210	49,3
Сірковуглець	0,15	0,37	1,626	380	45
Тетрахлометан	0,18	0,97	1,466	265	76,8
Амілхлорид	0,26	0,43	1,413	225	108,2
Ксилоли	0,26	0,62-0,81	1,500	290	138-144
Діізопропіловий етер	0,28	0,37	1,368	220	69
Ізопропілхлорид	0,29	0,33	1,378	225	34,8
Толуол	0,29	0,59	1,496	285	110,8
<i>n</i> -Пропілхлорид	0,30	0,35	1,389	225	46,6
Хлорбензол	0,30	0,80	1,525	280	132
Бензол	0,32	0,65	1,501	280	80,1
Брометан	0,37	0,41	1,424	225	38,4
Диетиловий етер	0,38	0,23	1,353	220	34,6
Хлороформ	0,40	0,57	1,443	245	61,3
Метиленхлорид	0,42	0,44	1,424	245	40,0
Тетрагідрофуран	0,45	0,51	1,408	220	64,7
1,2-Дихлоретан	0,49	0,79	1,445	230	84,1
Метилетилкетон	0,51	0,43	1,381	330	79,6
Ацетон	0,56	0,32	1,359	330	56,2
Діоксан	0,56	1,54	1,422	220	101,3
Етилацетат	0,58	0,54	1,370	260	77,2
Метилацетат	0,60	0,37	1,362	260	57,1
Аміловий спирт	0,61	4,10	1,410	210	137,3
Диметилсульфоксид	0,62	2,24	1,478	270	190
Анілін	0,62	4,4	1,586	325	184
Нітрометан	0,64	0,67	1,394	380	101,2
Ацетонітрил	0,65	0,37	1,344	210	81,6
Піридин	0,71	0,94	1,510	305	115,5
Ізопропанол	0,82	2,30	1,380	210	82,4
<i>n</i> -Пропанол	0,82	2,30	1,385	210	97,2

Етанол	0,88	1,20	1,361	210	78,4
<i>Продовження таблиці 4.2</i>					
1	2	3	4	5	6
Метанол	0,95	0,60	1,329	210	64,6
Етиленгліколь	1,11	19,9	1,427	210	198
Оцтова кислота	Великий	1,26	1,372	250	118,5
Вода	Великий	1,00	1,333	200	100

Таблиця 5.2.

Приклади елюотропних рядів для адсорбційної хроматографії на силікагелі

ϵ^0	А	Б	В
0,00	Пентан	Пентан	Пентан
0,05	4,2% ізопропілхлориду/ пентан	3% метиленхлориду/ пентан	4% бензолу/пентан
0,10	10% ізопропілхлориду/ пентан	7% метиленхлориду/ пентан	11% бензолу/пентан
0,15	21% ізопропілхлориду/ пентан	14% метиленхлориду/ пентан	26% бензолу/пентан
0,20	4% диетилового етеру/ пентан	26% метиленхлориду/ пентан	4% етилацетату/пентан
0,25	11% диетилового етеру/ пентан	50% метиленхлориду/ пентан	11% етилацетату/пентан
0,30	23% диетилового етеру/ пентан	82% метиленхлориду/ пентан	23% етилацетату/пентан
0,35	56% диетилового етеру/ пентан	3% ацетонітрилу/бензол	56% етилацетату/пентан
0,40	2% метанолу/ диетило- вий етер	11% ацетонітрилу/бензол	
0,45	4% метанолу/ диетило- вий етер	31% ацетонітрилу/бензол	
0,50	8% метанолу/ диетило- вий етер	Ацетонітрил	
0,55	20% метанолу/ диетило- вий етер		
0,60	50% метанолу/ диетило- вий етер		

Таблиця 5.3.

Приклади елюотропних рядів для адсорбційної хроматографії на оксиді алюмінію

ε^0	А	Б	В
0,00	Пентан	Пентан	Пентан
0,05	8% ізопропілхлориду/ пентан	1,5% метиленхлориду/ пентан	4% диетилового етеру/ пентан
0,10	19% ізопропілхлориду/ пентан	4% метиленхлориду/ пентан	9% диетилового етеру/ пентан
0,15	34% ізопропілхлориду/ пентан	8% метиленхлориду/ пентан	15% диетилового етеру/ пентан
0,20	52% ізопропілхлориду/ пентан	13% метиленхлориду/ пентан	25% диетилового етеру/ пентан
0,25	5% метилацетату/пентан	22% метиленхлориду/ пентан	38% диетилового етеру/ пентан
0,30	8% метилацетату/пентан	34% метиленхлориду/ пентан	55% диетилового етеру/ пентан
0,35	13% метилацетату/ пентан	54% метиленхлориду/ пентан	81% диетилового етеру/ пентан
0,40	19% метилацетату/ пентан	84% метиленхлориду/ пентан	4% піридину/пентан
0,45	29% метилацетату/ пентан	1% ацетонітрилу/ диетиловий етер	8% піридину/пентан
0,50	44% метилацетату/ пентан	5% ацетонітрилу/ диетиловий етер	13% піридину/пентан
0,55	65% метилацетату/ пентан	14% ацетонітрилу/ диетиловий етер	20% піридину/пентан
0,60	5% ізопропанолу/ диетиловий етер	36% ацетонітрилу/ диетиловий етер	32% піридину/пентан
0,65	10% ізопропанолу/ диетиловий етер	Ацетонітрил	
0,70	20% ізопропанолу/ диетиловий етер		
0,75	3% метанолу/ диетиловий етер		
0,80	7% метанолу/ диетиловий етер		
0,85	17% метанолу/ диетиловий етер		
0,90	40% метанолу/ диетиловий етер		

Таблиця 5.4.

Функціональні групи органічних іонообмінників

Формула	Матриця ^а	Тип ^б
Катіоніти		
$-\text{SO}_3^-$	с.	A ₁
$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	с.	A ₁
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{SO}_3^-$	ц., д.	A ₁
$-\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$	д.	A ₁
$-\text{PO}_3^{2-}$	ц.,	A ₂
$-\text{COO}^-$	г., с.	A ₃
$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	ц., д., с.	A ₃
Аніоніти		
$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	с.	B ₁
$-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$	с.	B ₁
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	ц.	B ₁
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	ц., д.	B ₁
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NHC}^+(\text{NH}_2)_2$	ц.	B ₂
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	с.	B ₂
$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_3^+$	ц.	B ₃
$-(\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2)_n\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_3^+$	ц.,	B ₃
$-\text{NHR}_2^+$	с.	B ₃
$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_3^+$	ц.	B ₃

^а Матриця: с. – смола, ц. – целюлоза, д. – полідекстран, г. – гідрофільний синтетичний гель.

^б Тип: A₁ – сильнокислотний, A₂ – середньокислотний, A₃ – слабокислотний, B₁ – сильноосновний, B₂ – середньосновний, B₃ – слабоосновний.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Айвазов Б.В. Основы газовой хроматографии. М.: «Высшая школа», 1977. – 183 с.
2. Айвазов Б.В. Практическое руководство по хроматографии. М.: «Высшая школа», 1968. – 280 с.
3. Ахрем А.А., Кузнецова А.И. Тонкослойная хроматография. М.: «Наука», 1965. – 175 с.
4. Высокоэффективная тонкослойная хроматография. /Под ред. А.Златкиса и Р. Кайзера/. М.: «Мир», 1979. – 245 с.
5. Гольдберг К.А., Видергауз М.С. Курс газовой хроматографии. М.: «Химия», 1967. – 400 с.
6. Количественный анализ хроматографическими методами. /Под ред. Э. Кэц/. М.: «Мир», 1990. – 320 с.
7. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам. /Под ред. О. Микеша/. М.: «Мир», 1982. – Ч. 1. – 400 с., – Ч. 2. – 381 с.
8. Перри С., Амос Р., Брюер П. Практическое руководство по жидкостной хроматографии. М.: «Мир», 1974. – 260 с.
9. Приборы для газовой хроматографии. /Сакодынский К.И., Бражников В.В., Волков С.А., Зельвенский В.Ю./ М.: «Машиностроение», 1987. – 264 с.
10. Прикладная хроматография. /Под ред. Сакодынского К.И./ М.: «Наука», 1984. – 312 с.
11. Руководство по газовой хроматографии. /Под ред. Э. Лейбница, Х.Г.Штруппе/. М.: «Мир», 1988. – Ч. 1. – 480 с., – Ч. 2. – 481 с.
12. Руководство по ионообменной, распределительной и осадочной хроматографии. /Ольшанова К.М., Потапова М.А., Копылова В.Д., Морозова Н.М./ М.: «Химия», 1965. – 200 с.
13. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: «Химия», 1986. – 288 с.
14. Тесаржик К, Комарек К. Капиллярные колонки в газовой хроматографии. М.: «Мир», 1987. – 224 с.