

Содержание

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

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

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

4.5. Колонки для ВЭЖХ	188
4.5.1. Нормальнофазовая хроматография	189
4.5.2. Химически привитые полярные фазы	190
4.5.2.1. Диольная фаза	191
4.5.2.2. NH ₂ фаза	191
4.5.2.3. CN фаза	192
4.5.3. Обращеннофазовая хроматография	192
4.5.4. Эксклюзионная хроматография	196
4.6. Выбор методов ВЭЖХ анализа	201
4.6.1. Пробоподготовка	201
4.6.2. Хроматографическое разделение	202
4.6.2.1. Условия нормальнофазовой хроматографии	203
4.6.2.2. Условия обращеннофазовой хроматографии	206
4.6.3. Оптимизация растворителя	207
4.6.3.1. Компьютерная оптимизация	207
4.6.4. Детектирование	209
4.7. ВЭЖХ детекторы	210
4.7.1. Общие требования к ВЭЖХ детекторам	210
4.7.2. Детекторы УФ- и видимого диапазона	212
4.7.3. Детектор с диодной линейкой	217
4.7.4. Дифференциальный рефрактометр	221
4.7.5. Флуоресцентный детектор	222
4.7.5.1. Флуоресценция и фосфоресценция	223
4.7.5.2. Применение флуоресцентного детектора	225
4.7.6. Электрохимический детектор	227
4.7.7. Детекторы светорассеяния	229
4.7.8. Специальные детекторы	231
4.7.9. Транспортные детекторы	231
4.7.10. Комбинированные методы ВЭЖХ	232
4.7.10.1. Хромато-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС)	232
4.7.10.2. ВЭЖХ-ИК	236
4.7.10.3. ВЭЖХ-ЯМР	237
4.7.10.4. ВЭЖХ индукционносвязанная плазма (ИСП)	237
4.7.10.5. ВЭЖХ-ГХ	237
4.8. Производственная ВЭЖХ	238
4.9. Миниатюризация ВЭЖХ	240
4.9.1. Микроколоночная техника	241
4.9.1.1. Преимущества микроколоночной хроматографии	242
4.9.2. Капиллярная ЖХ	243
4.9.2.1. Преимущества капиллярной ЖХ	244
4.9.2.2. Системные ошибки микрометода	246
4.10. Препаративная ВЭЖХ	248
4.11. Выводы	250
4.11.1. Сравнение ГХ-ВЭЖХ	250
4.11.1.1. Хроматографические колонки	252

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

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

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

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

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

Предисловие

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

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

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

*Профессор Георг Швед,
Технический университет, Клаусталь*

Предисловие автора

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ю. Бёккер

ГЛАВА I

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.1. Знание – сила

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

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

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

¹ ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

² СКФХ – сверхкритическая флюидная хроматография.

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

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

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

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

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

ГЛАВА 2

ТЕХНИКА ХРОМАТОГРАФИИ

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

2.1. История хроматографии

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

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

Свой метод Цвет назвал

Хроматография = Запись цвета

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.1.1. Путь развития

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2. Принцип

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

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

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

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

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

Классификацию хроматографических методов можно провести, учитывая три различных аспекта:

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

2.2.1. Классификация по типу агрегатного состояния фаз

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

2.2.2. Классификация по типу процесса разделения

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

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

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

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

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

Но истина, очевидно, лежит где-то посередине.

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

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

Примечание.

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

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

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

⁴ Бумажная хроматография (англ.: Paper chromatography).

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

2.2.3. Классификация по технике проведения

Результатом хроматографического разделения является хроматограмма. Разделяют два вида хроматограмм.

ВНЕШНЯЯ ХРОМАТОГРАММА

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

ВНУТРЕННЯЯ ХРОМАТОГРАММА

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

2.3. Теоретические основы

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

2.3.1. Хроматографический процесс

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

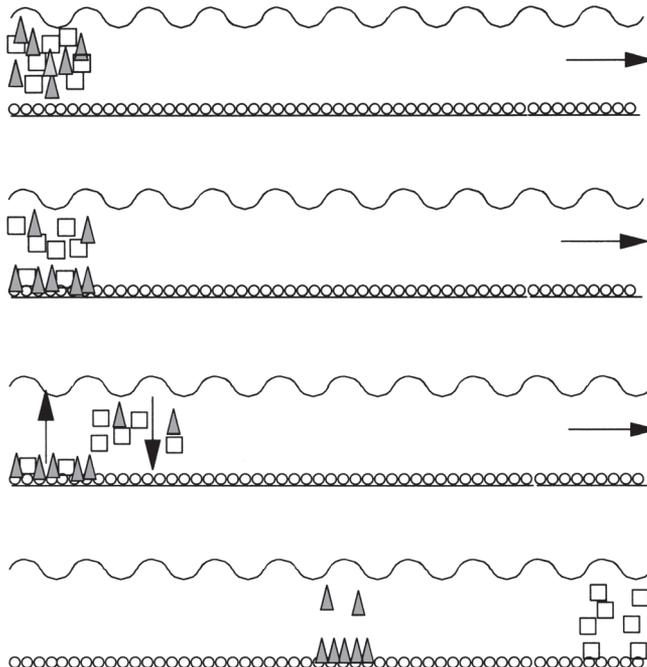


Рис. 2.1. Процесс хроматографического разделения

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

2.3.2. Уширение зон

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

ФАКТОР 1: ПРОДОЛЬНАЯ ДИФфуЗИЯ (РАСSEИВАЮЩАЯ ДИФфуЗИЯ)

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

ФАКТОР 2: РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СКОРОСТИ ПОТОКА

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

ФАКТОР 3: ДИФфуЗИЯ МОЛЕКУЛ ПРОБЫ В ПОДВИЖНОЙ ФАЗЕ

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

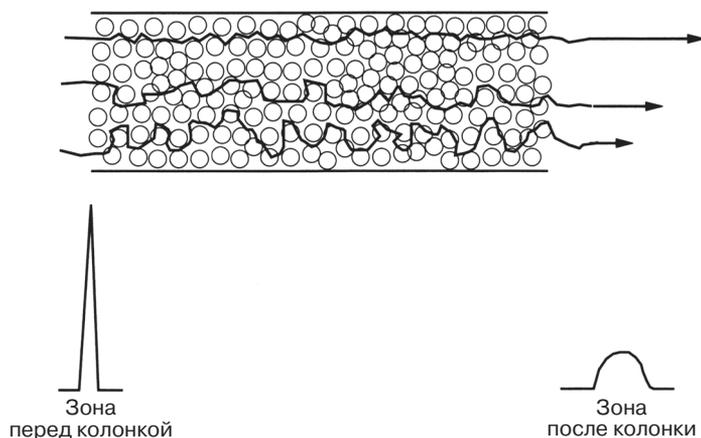


Рис. 2.2. Продольная диффузия в хроматографическом канале

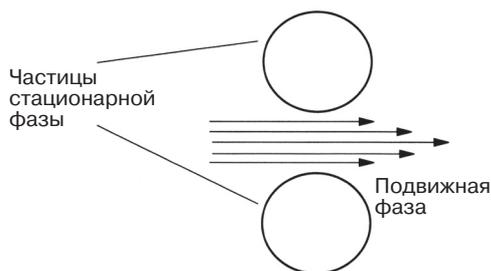


Рис. 2.3. Распределение скоростей потока в хроматографическом канале

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

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

ФАКТОР 4: ДИФФУЗИЯ В ПОРАХ СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЫ

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

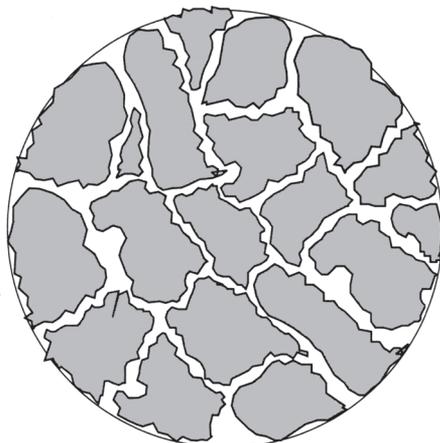


Рис. 2.4. Структура пор стационарной фазы

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

Уширение полос можно минимизировать следующими методами:

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

2.4. Колоночная хроматография

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

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

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

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

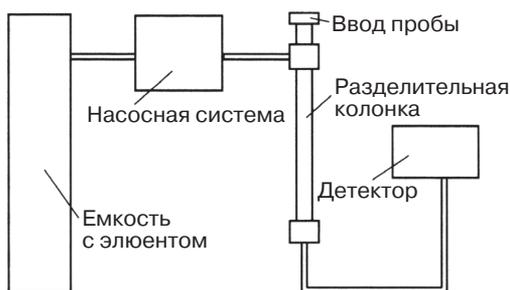


Рис. 2.5. Принципиальная схема хроматографа для колоночной хроматографии

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

2.4.1. Хроматограмма и что она дает

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

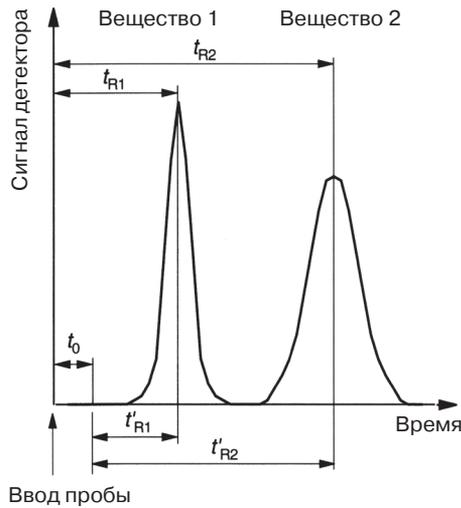


Рис. 2.7. Хроматограмма и ее характеристики

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

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

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

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

2.4.2. Теоретические тарелки

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.4.3. Диаграмма Ван-Деемтера

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

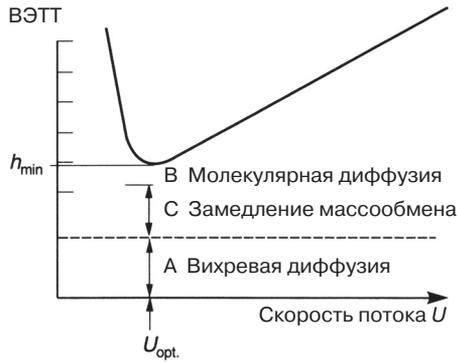


Рис. 2.8. Зависимость ВЭТТ от скорости потока

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

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

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

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

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

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

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

Таким образом, три основные причины уширения пиков следующие:

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

2.4.4. Аппаратура

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

2.4.4.1. Система насосов

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

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

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

2.4.4.2. Ввод пробы

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

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

2.4.4.3. Хроматографическая колонка

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

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

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

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

2.4.4.4. Детектор

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

Хроматографический детектор можно определить следующим образом.

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

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

Идеальный детектор должен

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

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

СЕЛЕКТИВНОСТЬ

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

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

УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ДЕТЕКТОРЫ

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

СЕЛЕКТИВНЫЕ ДЕТЕКТОРЫ

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

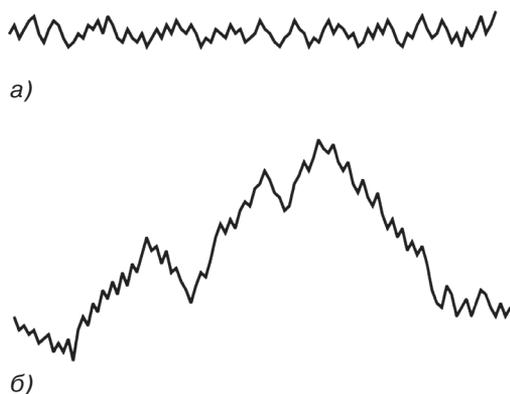


Рис. 2.9. Высоко- и низкочастотный шум

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ДЕТЕКТОРЫ

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

ШУМ

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

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

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

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

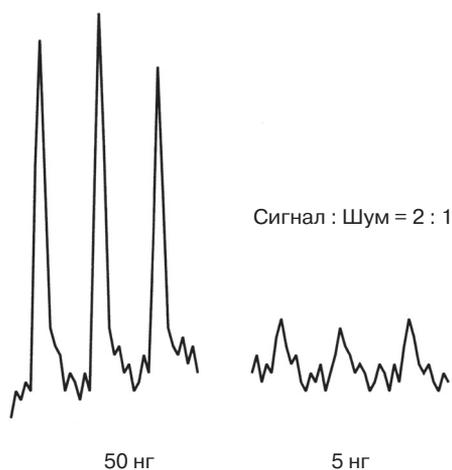


Рис. 2.10. Наименьший детектируемый сигнал

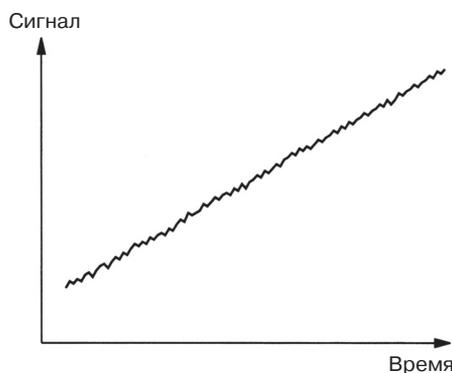


Рис. 2.11. Дрейф

ДРЕЙФ

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

ЛИНЕЙНЫЙ ДИАПАЗОН

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

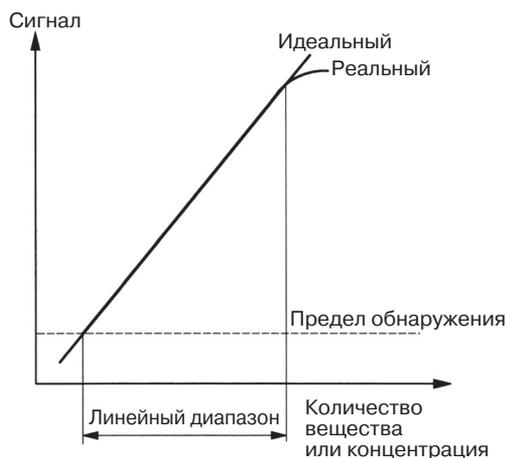


Рис. 2.12. Линейный диапазон детектора

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

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

ПОСТОЯННАЯ ВРЕМЕНИ

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

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

ДРУГИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДЕТЕКТОРОВ

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

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

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ДЕТЕКТОРОВ

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



Рис. 2.13. Обычные конфигурации мультidetекторных систем

ПОСТКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ

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

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕХНИКА

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

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

2.5. Интеграторы

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

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

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

2.5.1. Преимущества интеграторов

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

2.5.2. Процесс интегрирования

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

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

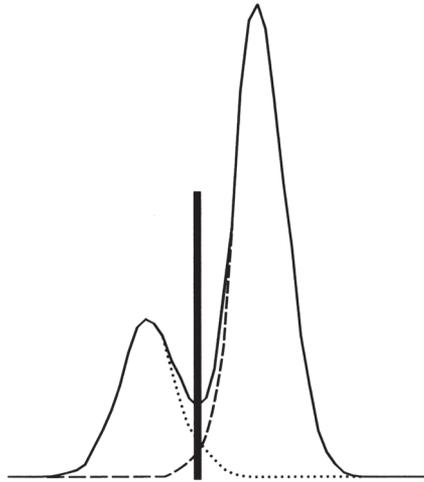


Рис. 2.14. Расчет площади пиков с помощью построения перпендикуляра

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

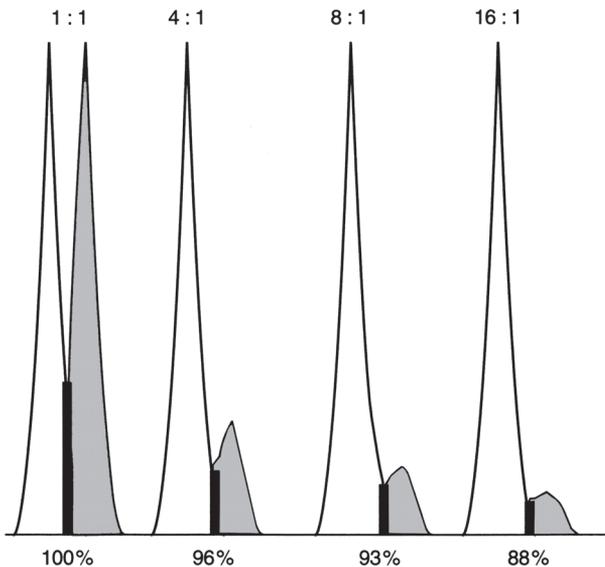


Рис. 2.15. Ошибка при определении площади пика с помощью построения перпендикуляра

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

2.5.3. Критерии выбора при приобретении интегратора

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

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

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

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

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

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

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