

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова

Химический факультет

Кафедра аналитической химии

Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В.

Хроматографические методы анализа

Методическое пособие для специального курса

Ответственный редактор

Чл.-корр. РАН, профессор О.А.Шпигун

Москва, 2007

Настоящее пособие составлено в соответствии с программой практических занятий и лекций специального курса «Хроматографические методы анализа» для студентов 4 – 5 курсов химического факультета Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова. Пособие содержит описание практических работ (раздел 6), выполняемых студентами в рамках спецпрактикума по хроматографическим методам. Для лучшего понимания материала и освоения практических навыков в анализе объектов окружающей среды перед описанием практических работ в пособии представлен теоретический материал по отдельным разделам газовой, высокоэффективной жидкостной, планарной хроматографии и капиллярному электрофорезу (разделы 1– 5). Раздел 7 посвящен особенностям эксплуатации хроматографических колонок для ВЭЖХ. Для закрепления полученных знаний в разделе 8 приводятся вопросы по рассмотренным вариантам хроматографии. Авторы благодарят к.х.н. Глазкова И.Н. и м.н.с Бендрышева А.А. за предоставленные материалы при написании пособия.

Все замечания и пожелания студентов и преподавателей будут приняты авторами с глубокой благодарностью.

Оглавление	стр
1. Основные положения хроматографии	4
2. Газовая хроматография	11
2.2. Газо-адсорбционная хроматография	21
2.3. Газо-жидкостная хроматография	30
2.3. Капиллярная газовая хроматография	34
2.4. Реакционная газовая хроматография	46
2.5. Хромато-масс-спектрометрия	51
3. Высокоэффективная жидкостная хроматография	57
3.1. Молекулярная адсорбционная хроматография	58
3.1.1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ)	63
3.1.2. Использование ОФ ВЭЖХ для решения экологических задач	74
3.2. Ионная хроматография	96
4. Планарная (тонкослойная) хроматография	110
5. Капиллярный электрофорез	130
6. Практические работы	143
7. Особенности эксплуатации колонок для ВЭЖХ	177
7.1. Подготовка растворителя и пробы	177
7.2. Типичные неисправности, способы обнаружения и устранения	180
7.3. Методические аспекты обеспечения высокой эффективности колонки	182
7.4. Проблемы изменения селективности колонок	189
7.5. Проблемы воспроизводимости между параллельными вводами пробы	191
7.6. Регенерация загрязненных колонок	194
8. Вопросы	197
9. Литература	203

Хроматография в настоящее время является наиболее широко используемым методом исследования объектов окружающей среды.

Хроматографический метод был предложен в 1903 году русским ученым М.С. Цветом. Он писал: «При фильтрации смешанного раствора через столб адсорбента пигменты... расслаиваются в виде отдельных, различно окрашенных зон. Подобно световым лучам в спектре, различные компоненты сложного пигмента закономерно распределяются друг за другом в столбе адсорбента и становятся доступными качественному определению. Такой расщеченный препарат я назвал *хроматограммой*, а соответствующий метод анализа *хроматографическим методом*. Работы М.С.Цвета послужили фундаментом для развития остальных видов хроматографии для разделения как окрашенных, так и неокрашенных соединений, осуществляемых в любых средах.

1. Основные положения хроматографии

Хроматография – это метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной. *Неподвижной* (стационарной) фазой служит твердое пористое вещество (часто его называют *сорбентом*) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. *Подвижная* фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу, иногда под давлением.

Компоненты анализируемой смеси (*сорбаты*) вместе с подвижной фазой передвигаются вдоль стационарной фазы. Ее обычно помещают в стеклянную или металлическую трубку, называемую колонкой. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо другому механизму) компоненты будут

перемещаться вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты останутся в верхнем слое сорбента, другие, в меньшей степени взаимодействующие с сорбентом, окажутся в нижней части колонки, а некоторые и вовсе покинут колонку вместе с подвижной фазой (такие компоненты называются *неудерживаемыми*, а время их удерживания определяет “*мертвое время*” колонки).

Таким образом происходит быстрое разделение сложных смесей компонентов. Следует подчеркнуть следующие достоинства хроматографических методов:

1. Разделение носит динамический характер, причем акты сорбции-десорбции разделяемых компонентов повторяются многократно. Этим обусловлена значительно большая эффективность хроматографического разделения по сравнению со статическими методами сорбции и экстракции.

2. При разделении используют различные типы взаимодействия сорбатов и неподвижной фазы: от чисто физических до хемосорбционных. Это обуславливает возможность селективного разделения широкого круга веществ.

3. На разделяемые вещества можно накладывать различные дополнительные поля (гравитационное, электрическое, магнитное и др.), которые, изменяя условия разделения, расширяют возможности хроматографии.

4. Хроматография – гибридный метод, сочетающий одновременное разделение и определения нескольких компонентов.

5. Хроматография позволяет решать как аналитические задачи (разделение, идентификация, определение), так и препаративные (очистка, выделение, концентрирование). Решение этих задач можно сочетать, выполняя их в режиме “on line”.

Многочисленные методы классифицируются по агрегатному состоянию фаз, механизму разделения и технике проведения разделения. Хроматографические методы различаются и по способу проведения процесса разделения на фронтальный, вытеснительный и элюентный.

Для решения аналитической задачи используется *элюентный метод*, он имеет следующие достоинства:

- дает наиболее полное разделение, поскольку зоны сорбатов разделены зонами элюента;
- сорбент непрерывно регенерируется;
- параметры удерживания хорошо воспроизводимы.

Элюентная хроматограмма, являющаяся зависимостью сигнала прибора (ось ординат) от времени или объема подвижной фазы (ось абсцисс), представляет собой совокупность пиков разделяемых компонентов. Обычно отдельный пик представляет собой *гауссову кривую*. Типичная хроматограмма приведена на рис. 1.

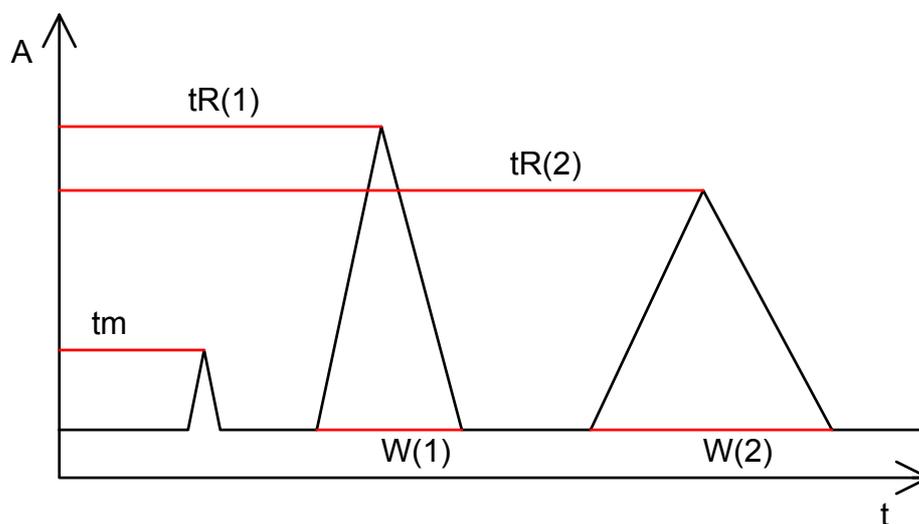


Рис. 1. Хроматограмма смеси двух веществ

Рассмотрим основные хроматографические параметры, характеризующие поведение вещества в колонке. Время от момента ввода анализируемой пробы до момента регистрации максимума

хроматографического пика называют *временем удерживания* и обозначают – t_R . Время удерживания складывается из двух составляющих – времени пребывания веществ в подвижной фазе (t_m) и времени пребывания в неподвижной фазе (t_s)

Значение t_m фактически равно времени прохождения через хроматограф несорбируемого компонента. Значение t_R не зависит от количества пробы, вводимой в колонку, но зависит от природы вещества и сорбента (если изотерма сорбции вещества линейна), а также от упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке. Поэтому для характеристики истинной удерживающей способности колонки следует ввести *исправленное время удерживания* (t'_R)

$$t'_R = t_R - t_m \quad (1)$$

Часто для характеристики удерживания используют *удерживаемый объем* – V_R – объем подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определенной скоростью, чтобы элюировать вещество:

$$V_R = F \cdot t_R \quad (2),$$

где F – объемная скорость потока подвижной фазы ($\text{см}^3/\text{с}$) или (мл/мин).

По полученной хроматограмме смеси (рис. 1) можно рассчитать экспериментальные значения хроматографических параметров: *фактор удерживания (емкости) (k)*, *коэффициент селективности (α)*, *разрешение (R_s)* и *оценить эффективность хроматографической колонки*.

Фактор удерживания показывает во сколько раз дольше вещество пребывает в неподвижной фазе, чем в подвижной. Стараются выбирать условия хроматографического разделения таким образом, чтобы эта величина составляла от 1,5 до 4. k рассчитывают по формуле:

$$k = \frac{V_R - V_m}{V_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (3)$$

Расстояние между максимумами хроматографических пиков определяет селективность неподвижной фазы. **Фактор разделения (коэффициент селективности) α** есть мера относительного удерживания или относительной подвижности двух разделяемых веществ, и описывается уравнением:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = D_2/D_1 \quad (4)$$

Для разделения двух веществ необходимо подобрать условия разделения так, чтобы $D_1 \neq D_2$ и $\alpha > 1,00$.

Степень размывания хроматографического пика определяет эффективность колонки. Чем эффективнее колонка, тем уже пик, тем большее число компонентов можно разделить за более короткое время, т.е. время анализа сокращается. Количественно эффективность колонки может быть выражена **числом теоретических тарелок N** . Согласно концепции теоретических тарелок хроматографическую колонку представляют как ряд дискретных, соприкасающихся горизонтальных слоев, на которых мгновенно устанавливается равновесие между неподвижной и подвижной фазами, и акт сорбции-десорбции вещества повторяется многократно на каждом слое. Высота слоя – **высота, эквивалентная теоретической тарелке**, обозначается через H . Между параметрами существует соотношение:

$$H = L/N \quad (5),$$

где L - длина колонки.

Чем меньше H , тем большее число раз устанавливается равновесие между фазами при данной длине колонки, тем эффективнее разделение компонентов анализируемой смеси.

Из экспериментальных данных рассчитывают N по формуле:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (6),$$

где W – ширина пика у основания.

Разделение двух соседних пиков характеризуется *разрешением* R_S .

Разрешение является мерой полноты разделения двух веществ. Разделение считается полным, если R_S равно или больше 1,5.

Суммарное влияние основных параметров хроматографической колонки (эффективности, селективности и коэффициентов удерживания) на разрешение хроматографических пиков описывается уравнением:

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{1 + k_2} \right) \quad (7)$$

Таким образом, полнота разделения компонентов является функцией D , R_S , N и L .

Полученная хроматограмма анализируемой смеси позволяет определить ее качественный и количественный состав. Качественной характеристикой определяемых веществ являются их времена удерживания (объемы удерживания) и другие характеристики удерживания (t'_R , V'_R , k , индексы удерживания). Для целей идентификации используют также корреляционные зависимости параметров удерживания с некоторыми физико-химическими свойствами соединений в гомологическом ряду (например, числом метиленовых групп, температурой кипения).

Сопоставление площадей или высот хроматографических пиков позволяет оценить количественный состав смеси. В хроматографии используют три основных метода количественного анализа.

Метод абсолютной калибровки обычно предполагает построение градуировочного графика по стандартным смесям, как и в других физических методах.

В методе внутренней нормализации предполагается, что пики всех возможных компонентов смеси зафиксированы на хроматограмме, и сумма их площадей (S) равна 100%. Различия в чувствительности детектора к разным компонентам учитывается введением поправочных коэффициентов (K_i). Расчет ведут по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_i K_i}{\sum_{i=1}^n (S_i K_i)} 100 \quad (8),$$

где n - число компонентов смеси, S - площадь хроматографического пика, K_i - поправочные коэффициенты для каждого i-компонента.

Метод внутреннего стандарта предусматривает введение в анализируемый образец известного количества эталонного соединения, хроматографирование полученной смеси и расчет по формуле:

$$c_i(\%) = \frac{S_i}{S_{st}} k c_{st} \quad (9),$$

где c_{st} - концентрация внутреннего стандарта введенного в пробу, k - поправочный множитель, который рассчитывают по стандартной смеси эталонного соединения и определяемого вещества по формуле

$$k = S_{st} \cdot c_i / S_i \cdot c_{st} \quad (10),$$

где индекс i относится к определяемому веществу, а st - стандарту.

В аналитической практике используют различные варианты хроматографического разделения: жидкостную или газовую; колоночную или плоскостную; адсорбционную, распределительную или ионообменную хроматографию.

2. Газовая хроматография

Газовая хроматография – метод разделения летучих, термостабильных соединений. Этим требованиям отвечает около 5% известных органических соединений, но именно эти соединения оставляют 70-80 % соединений, которые использует человек в сфере производства и быта. Подвижной фазой служит инертный газ (газ-носитель), протекающий через неподвижную фазу, имеющую большую поверхность. В качестве подвижной фазы можно использовать водород, гелий, азот, аргон и углекислый газ. Наиболее часто используют азот, как более доступный и дешевый. Газ-носитель обеспечивает перенос разделяемых компонентов по хроматографической колонке и не взаимодействует ни с разделяемыми веществами, ни с неподвижной фазой.

Достоинствами газовой хроматографии являются:

- сравнительная простота аппаратного оформления;
- весьма широкие границы применимости (можно определять соединения, для которых достигается давление насыщенного пара 0,001-1 мм рт.ст.);
- возможность определения с высокой точностью малых количеств газов органических соединений с высокой точностью;
- быстрота анализа;
- широкий выбор сорбентов и неподвижных фаз;
- высокая гибкость изменения условий разделения;
- возможность осуществления химических реакций в хроматографической колонке или детекторе, что расширяет круг анализируемых соединений (реакционная газовая хроматография);

– повышение информативности при сочетании с различными инструментальными методами (масс-спектрометрией и ИК(Фурье)спектрометрией).

На рис. 2 показана принципиальная схема хроматографа. Газовый хроматограф представляет собой совокупность нескольких узлов.

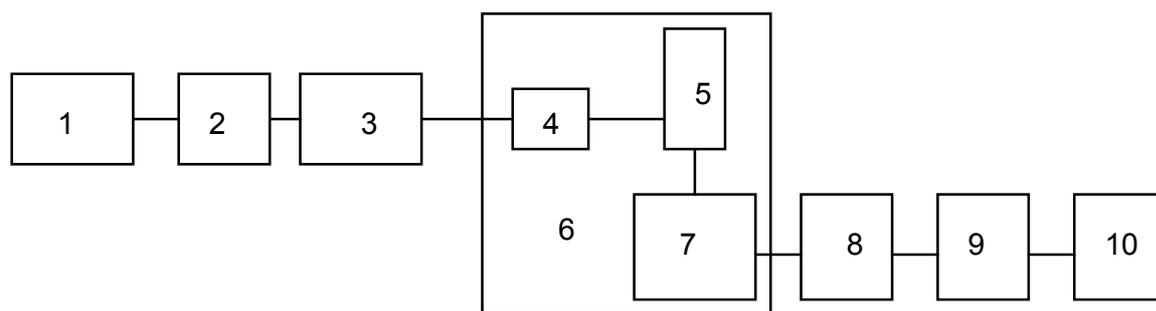


Рис. 2. Принципиальная схема газового хроматографа

Стабилизация и очистка газовых потоков происходит в системе подготовки газов, которая состоит из баллона с газом-носителем (1) и блока подготовки газов (2). Блок подготовки газов включает: дроссель, регулятор давления, регулятор потока.

Дозирование и ввод пробы осуществляется с помощью медицинского или микрошприца (для парообразной или жидкой пробы соответственно) или дозирующей петли (3). Пробы вводятся через резиновую мембрану в **испаритель** (4) – специальное устройство для испарения пробы. Затем потоком газа-носителя проба переносится в **колонку** (5), которая помещена в термостат (6). Для более точного дозирования или ввода нестандартных проб можно использовать специальные дозирующие устройства:

дозирование давлением; микродозатор-микродиппер (пробы < 1 мкл); устройство для ввода твердых проб; герметичные пробоотборные колонки.

При введении пробы должны соблюдаться следующие условия:

- минимальный водимый объем;
- проба не должна быть направлена навстречу потока газа-носителя и искажать характеристики потока;
- воспроизводимость пробы с большой степенью точности;
- испарение без разложения;
- смеси компонентов должны вводиться и испаряться без изменения состава;
- количество вещества в пробе должно быть намного меньше емкости колонки.

Система детектирования состоит из **детектора** (7) с блоком питания (8), усилителя сигнала детектора (9) и регистрирующего устройства (10). В систему детектирования может быть включен электронный интегратор, измеряющий параметры хроматографических пиков.

Испаритель и детектор, как и колонку, термостатируют.

В газовой хроматографии используют насадочные, капиллярные и поликапиллярные колонки, их сравнение показано в табл. 1. Использование капиллярных колонок позволяет существенно повысить эффективность разделения, а поликапиллярных – не только получить высокую эффективность, но и провести разделение за очень короткое время. На рис. 3. показано разделение смеси легких углеводов из 12 компонентов за 15 сек.

Таблица 1. Сравнение различных типов колонок для газовой хроматографии

Параметр	Насадочные	Капиллярные	Поликкапиллярные
Длина колонки, м	1-6	10-100	0,4-1,2
Внутренний диаметр, мм	2-4	0,25-0,35	0,01-0,1 пакет из 1000 и более капилляров
Среднее число теоретических тарелок	5000	150000	10000
Толщина пленки, мкм	1-10	0,005-0,5	0,005-0,05

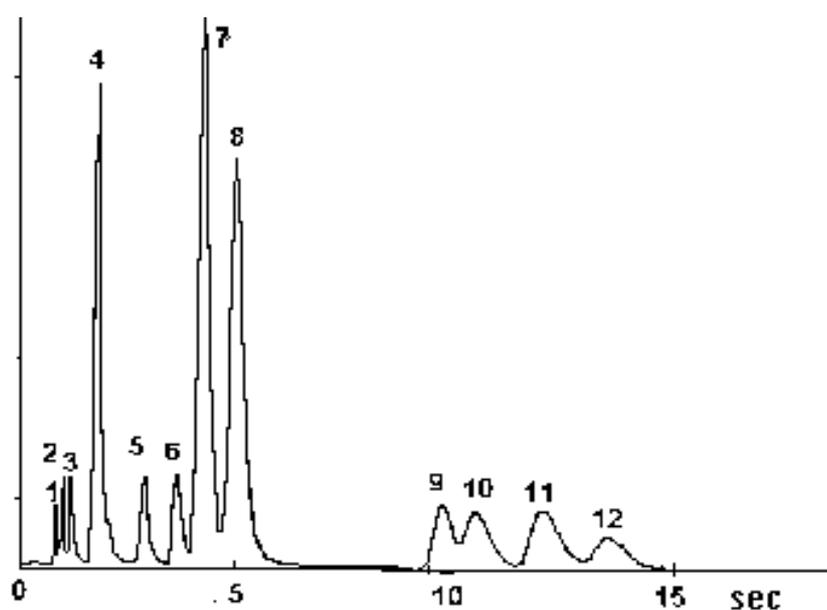


Рис. 3. Разделение углеводородов C_1-C_4 на газоадсорбционной поликапиллярной колонке: 1-метан, 2-этан, 3-этилен, 4-пропан, 5-ацетилен, 6-пропилен, 7-изобутан, 8-бутан, 9-*транс*-бутен, 10-изобутен, 11-бутен-1, 12-*цис*-бутен. Газ-носитель – азот, температура колонки $60^\circ C$. Сорбент – ППГ/бутоксид

В газовой хроматографии используют широкий круг **детекторов**, которые можно подразделить на интегральные и дифференциальные. *Интегральные* – регистрируют изменение во времени суммарного количества всех компонентов, *дифференциальные* – измеряют мгновенную концентрацию компонентов. На рис. 4 показан общий вид интегральной (а) и дифференциальной (б) хроматограмм. Дифференциальные детекторы в свою очередь подразделяют на концентрационные и потоковые.

В **концентрационном детекторе** сигнал определяется текущей концентрацией в ячейке и многократно регистрируется, зависит от скорости потока. Детектор такого типа – катарометр. **Потоковый детектор** регистрирует сигнал однократно, сигнал определяется мгновенным значением концентрации, не зависит от скорости потока. Пример такого детектора – пламенно-ионизационный детектор.

А.с

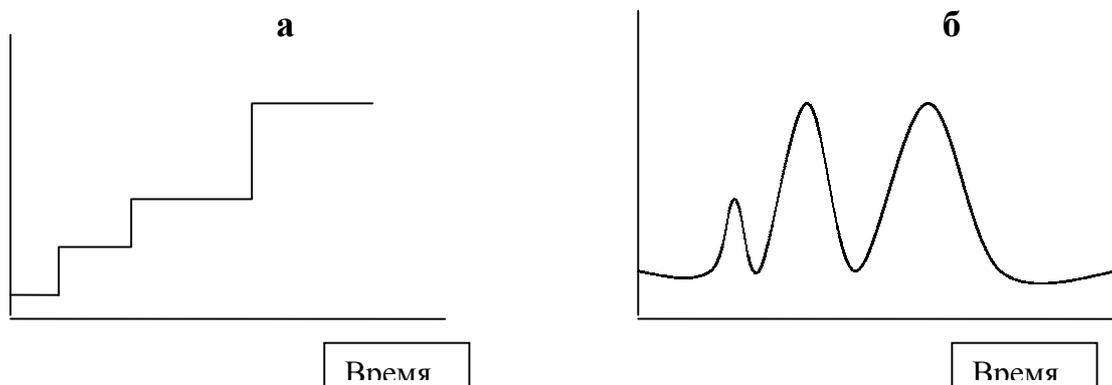


Рис. 4. Общий вид интегральной (а) и дифференциальной (б) хроматограмм.

Общие требования, предъявляемые к детекторам следующие:

- достаточная чувствительность для решения конкретной задачи;
- малая инерционность;
- малая зависимость показаний от параметров опыта (температуры, давления, скорости потока и др.);

- линейная связь между показаниями и концентрацией в широком интервале ее изменения;
- стабильность «нулевой линии»;
- легкость записи сигнала и передачи его на расстояние;
- простота, дешевизна.

Наиболее важные характеристики детекторов, определяющие их выбор: чувствительность, точность, число порядков линейного диапазона градуировочного графика (ГГ), инерционность. **Основные детекторы**, применяемые в газовой хроматографии приведены в табл. 2.

Универсальным является **катарометр – детектор по теплопроводности**, принцип работы которого основан на изменении температуры нагретых нитей (чувствительных элементов) в зависимости от теплопроводности окружающего газа, которая определяется его составом. Детектор измеряет различие в теплопроводности чистого газа-носителя и смеси газа-носителя с определяемым веществом. Чувствительность детектора определяется геометрическими характеристиками чувствительного элемента, электрическими параметрами чувствительного элемента и измерительного моста, теплопроводностью газа-носителя и анализируемого соединения. Для повышения чувствительности необходимо использовать газ-носитель с высокой электропроводностью (водород, гелий).

Похожими по конструкции являются **детектор по плотности газов** и **детектор по теплоте сгорания (термохимический)**. В детекторе по плотности газов измерение основано на различии плотностей газа-носителя и компонентов анализируемой смеси. Чувствительность детектора зависит от разности плотностей, в качестве газа-носителя рекомендуют использовать воздух, азот, аргон, диоксид углерода, и не использовать водород и гелий. Достоинствами этого детектора являются:

Таблица 2. Детекторы, используемые в газовой хроматографии

Название детектора	Селективность	Определяемые соединения	Минимально детектируемое количество	Число порядков линейного диапазона ГГ
Термохимический	Селективный	Горючие вещества	0,1%	2
Детектор по плотности газов	Универсальный	Соединения различной природы	$10^{-2}\%$	3
Катарометр	Универсальный	Соединения различной природы	$10^{-4}\%$ об	3
ПИД	Универсальный	Горючие органические соединения	10 пгС/с	7
ТИД	Селективный	Азот- и фосфор-содержащие соединения	1 пгN/с; 5 пгP/с	4
ФИД	Универсальный	Соединения различной природы	0,2 мкг/л	7
ЭЗП	Селективный	Галогенсодержащие соединения	0,2 пгCl/с	4
МС	Универсальный	Соединения различной природы	1 нг в режиме сканирования 1 пг в режиме масс-фрагментирования	5

отсутствие необходимости градуировки; возможность использования для агрессивных и каталитически неустойчивых соединений; возможность использования для определения молекулярной массы анализируемых веществ. Получение сигнала детектора по теплоте сгорания основано на измерении теплового эффекта при сгорании компонентов анализируемой пробы в присутствии катализатора (платины). Он не нашел широкого применения из-за следующих недостатков: применим только для анализа горючих веществ; не применим в препаративной хроматографии; имеет ограниченный интервал определяемых концентраций – (0,1 – 5) %.

Наиболее широко используются **ионизационные детекторы**, принцип работы которых основан на изменении ионного тока, вызванного введением в детектор анализируемого вещества. Ионный ток возникает под действием источника ионизации и электрического поля между электродами детектора.

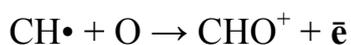
В качестве источников ионизации используют:

- пламена (пламенно-ионизационный детектор)
- электронную и ионную эмиссию (термоионный детектор)
- радиоактивные изотопы (детектор электронного захвата)
- электрический разряд
- фотоионизацию (фотоионизационный детектор)

В любой момент времени в детекторе достигается равновесие, в результате которого скорость образования заряженных частиц (ионов и электронов) равна сумме скоростей рекомбинации и сбора заряженных частиц на электродах детектора. Создаются условия, при которых либо плотность (концентрация) заряженных частиц, либо скорость переноса частиц в электрическом поле зависит от состава газа в камере детектора.

Пламенно-ионизационный детектор (ПЖД) – универсальный, чувствительный детектор, принцип действия которого основан на

измерении электропроводности воздушно-водородного пламени, которая резко возрастает при попадании в него малых количеств органических веществ. При этом в пламени пиролиз вещества обеспечивает наличие радикалов $\text{CH}\cdot$, которые по схеме



обеспечивают протекание тока. Атомы кислорода галогенов, серы, фосфора и азота могут взаимодействовать как с углеводородными радикалами, так и с ионами CHO^+ , уменьшая ионизационный ток и, следовательно, сигнал детектора.

Отклик ПИД пропорционален числу атомов углерода в молекуле, причем этот отклик мало меняется при переходе от одного класса органических соединений к другому. Быстрый отклик, стабильность сигнала, широкий линейный диапазон сделали ПИД наиболее широко используемым в настоящее время газохроматографическим детектором, которым оснащены все хроматографы.

Термоионный детектор (ТИД) селективен к азот- и фосфорсодержащим соединениям и является модификацией пламенно-ионизационного детектора. Особенность этого детектора состоит в том, что вблизи водородного пламени горелки помещают соль щелочного металла (шарик, содержащий бромид рубидия). Нагретая соль атомизируется и образующиеся при этом атомы рубидия диссоциируют на ионы и электроны, которые попадают в электрическое поле. В присутствии соединения, содержащего галоген, азот или фосфор, ионный ток возрастает, т.е. происходит селективное повышение эффективности ионизации соединений содержащих атомы азота и фосфора. В их число входит множество чрезвычайно опасных загрязнителей среды – гербицидов, инсектицидов и фунгицидов.

Селективным и чувствительным детектором для определения галогенсодержащих соединений является **электрозахватный детектор**

(ЭЗД). В детектор входит радиоактивный источник β -частиц, которые ионизируют молекулы газа-носителя, с образованием ионов и тепловых электронов, которые формируют электрический ток в камере детектора. Принцип действия этого детектора основан на уменьшении проводимости, вызываемом захватом электронов веществом, содержащим атомы с высокой электроотрицательностью.

Принцип действия *фотоионизационного детектора* (ФИД) заключается в ионизации молекул, элюируемых с хроматографической колонки под действием вакуумного УФ-излучения и измерении возникающего ионного тока. Изменяя энергию излучения, можно варьировать чувствительность детектирования соединений различных классов. Особенно низкий предел обнаружения у ФИД для ароматических углеводородов (при использовании лампы с энергией 10.2 эВ). Положительной особенностью ФИД является то, что он не разрушает детектируемые соединения, и его можно использовать в комбинации с другими детекторами для более надежной идентификации сложных смесей.

Наиболее информативным и чувствительным детектором, используемым в газовой хроматографии, является *масс-спектрометрический* детектор. Принцип действия детектора основан на том, что при ионизации молекулы в вакууме образуется группа характеристических ионов. Число образующихся ионов пропорционально количеству поступающего вещества, регистрируется изменение полного ионного тока, который пропорционален числу ионов. Одновременно с записью хроматограммы (зависимости полного ионного тока от времени) в любой ее точке, обычно на вершине хроматографического пика, может быть зарегистрирован масс-спектр (зависимость интенсивности ионного тока от массы иона). Масс-спектрометр в отличие от других спектроскопических детекторов регистрирует не излучение или

поглощение энергии молекулами или атомами вещества, а сами частицы вещества, измеряет их массы, вернее отношение массы к заряду. Таким образом, масс-спектрометрический детектор можно рассматривать как универсальный детектор, который позволяет определить состав анализируемой смеси и идентифицировать разделяемые компоненты.

Некоторые характеристики описанных выше детекторов, приведены в табл. 2.

Из других детекторов, важных для сложных экологических анализов, благодаря их высокой селективности, необходимо упомянуть *пламенно-фотометрический* (ПФД), *хемилюминесцентный* (ХЛД) детекторы, которые селективно определяют серо- и фосфорсодержащие соединения. Высокой чувствительностью и селективностью к соединениям, содержащим атомы галогенов, серы и азота, обладает *электролитический кондуктометрический детектор* (ЭДКД). При получении сигнала хлор превращается в хлористый водород, сера – в диоксид серы, азот – в аммиак, которые поглощаются определенным растворителем, изменение его электропроводности преобразуется в сигнал детектора. Но данные детекторы используются на практике значительно реже.

Различают два варианта метода: *газо-адсорбционную*, когда неподвижной фазой служит твердый носитель, и *газо-жидкостную хроматографию*, когда неподвижной фазой является вязкая, нелетучая жидкость, нанесенная на инертный носитель.

2.1. Газо-адсорбционная хроматография

Метод анализа смесей газов и легколетучих веществ. Разделение основано на различии в адсорбции на поверхности твердого носителя (адсорбента). Адсорбция может быть обусловлена неспецифическими

(ориентационными, индукционными и дисперсионными) и специфическими взаимодействиями (комплексобразованием, либо образованием водородной связи) и зависит от природы адсорбента и сорбата. В качестве адсорбентов используют пористые носители, которые обладают химической, физической и термической стабильностью; однородной поверхностью, равномерным распределением по размеру пор и известной адсорбционной активностью. Адсорбционная активность зависит от удельной поверхности (определяется геометрической структурой носителя) и удельной поверхностной энергии (определяется химической структурой поверхности). На рис. 5 и 6 показаны классификации адсорбентов по их геометрической структуре и химической природе, предложенные А.В. Киселевым. Достоинствами адсорбентов в качестве неподвижных фаз являются способность выдерживать высокие температуры, отсутствие фонового сигнала при работе с ионизационными детекторами и высокая селективность.

Адсорбенты делятся на неорганические, полимерные (органические) и модифицированные. Среди неорганических адсорбентов особо важны сорбенты на основе углеродных материалов. Это неполярные сорбенты, для них особую роль в процессе разделения играют геометрические параметры поверхности. Наиболее интересная особенность данных материалов – возможность разделения структурных изомеров.

Широко используются полярные неорганические сорбенты на основе двуокиси кремния. Особый интерес для газо-адсорбционной хроматографии представляет использование цеолитовых молекулярных сит ($M_{2/n}O \cdot Al_2O_3 \cdot xSiO_2 \cdot yH_2O$), которые успешно позволяют разделять различные газовые смеси.

Применение адсорбентов на основе Al_2O_3 ограничено из-за его гетерополярной поверхности, гигроскопичности и асимметрии пиков

разделяемых соединений. Сорбенты используют для разделения легких углеводов.

Наиболее многообразны полимерные сорбенты на основе пористых полимеров стирола и дивинилбензола и дивинилбензола. Их удается синтезировать с заданными свойствами и очень чистой поверхностью. Это гидрофобные сорбенты, слабо удерживающие полярные молекулы, содержащие гидрокси-амино-группы. Основная область применения полимерных сорбентов – разделение полярных и реакционно способных газов и высоко полярных органических соединений; определение воды в органических растворителях и летучих органических примесей в воде.

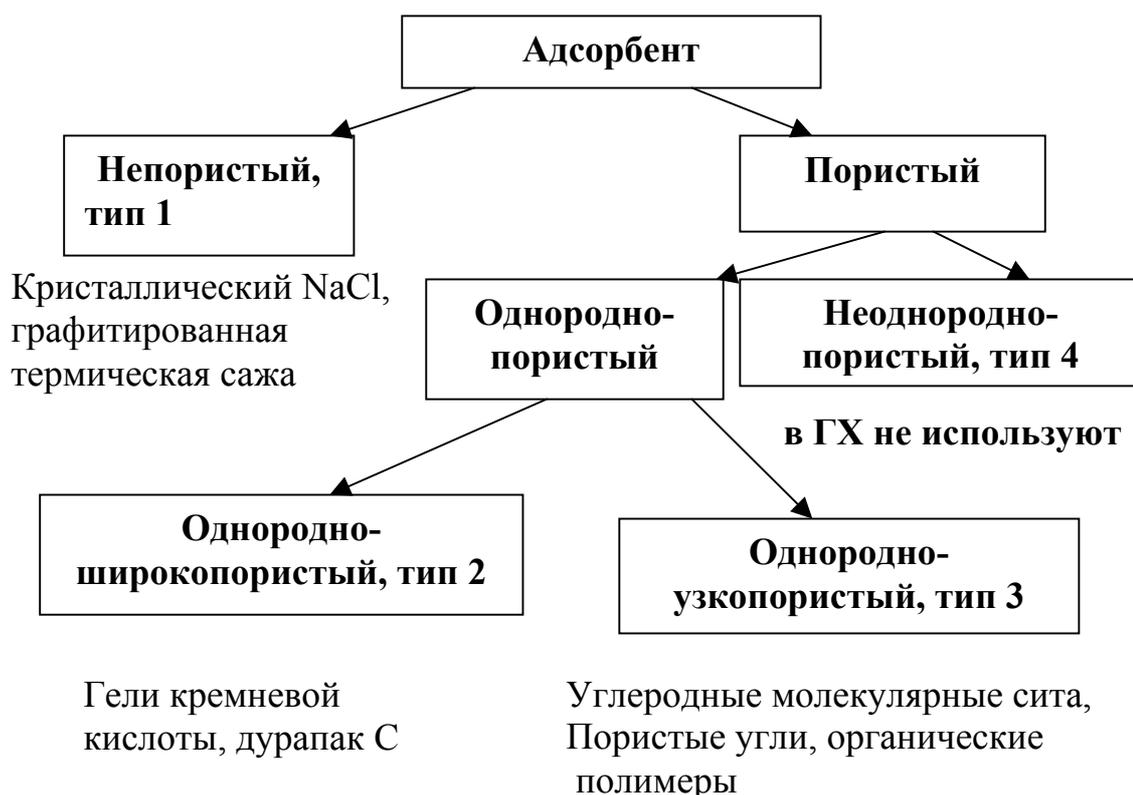


Рис. 5. Классификация адсорбентов по их геометрической структуре

Основные адсорбенты для газовой хроматографии и область их применения приведены в табл.3-4.

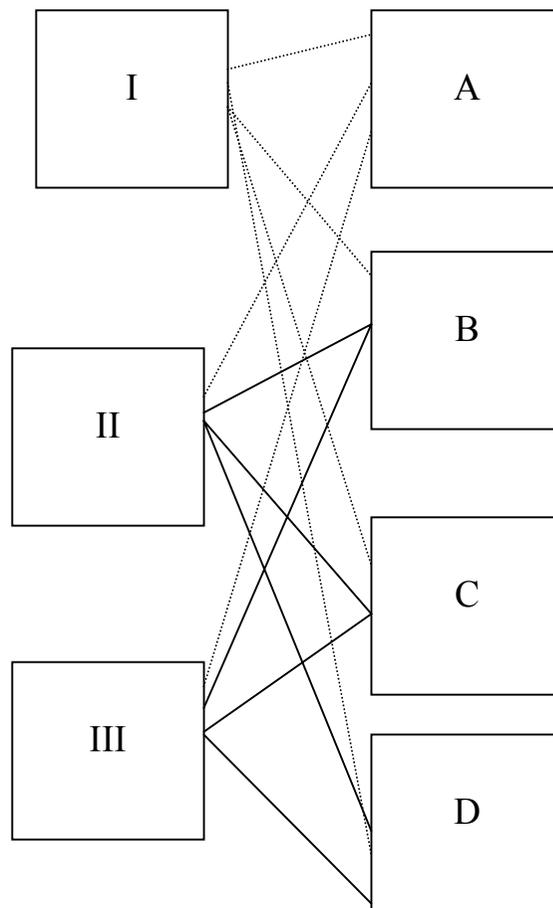
Поверхность – тип

Неполярная
(отсутствие ионов или функциональных групп)
ГТС. углеродные сорб.

Положительный заряд
-ОН группа
(гидрокс. SiO_2 иеолиты)

Отрицательный заряд
-CN, -O-, =C=O,
мод. поверхность,
(Дурапаки,

Группа



Взаимодействующие с поверхностью группы (связи)

Неполярная,
у-связи, инертные газы,
углеводороды

Высокая электронная плотность
Свободные элект. пары, р-связи
(олефины, ароматические соед.
=C=O. -NR₂. -OR. -CN)

Положительный заряд
(металлоорганические
соединения)

Соседн. группы с полож. и
отрицат. зарядами
(Образование ассоциатов)

Рис. 6. Классификация адсорбентов по их химической природе

Таблица 3. Неорганические адсорбенты в газо-адсорбционной хроматографии

Адсорбент	Химический характер поверхности адсорбента	Геометрическая структура поверхности адсорбента	Величина удельной поверхности, м ² /г	Разделяемые классы соединений
Графитированная термическая сажа	Неспецифический инертный	Непористая	6-12	Предельные и непредельные углеводороды, ароматические углеводороды, альдегиды, кетоны, спирты, амины, меркаптаны
Активный уголь	Неспецифический	Развитая, пористая	800-1000	Постоянные газы, легкие углеводороды
Углеродные молекулярные сита	Неспецифический малополярный	Микропористый (исключительно чистая поверхность)	1000-1200	Низшие (C ₁ -C ₅) спирты и жирные кислоты, Определение микропримесей воды в органических растворителях и органических соединений в воде
Силикагель	Специфический	Пористый	2-500	Газы, средне- и высококипящие соединения, содержащие группы с высокой электронной плотностью
Цеолитовые молекулярные сита	Специфический, гидрофильный	Микропористый, Регулярная система пор: набор одинаковых «больших пустот» связанных однородными микропорами	≈ 200	Газовые смеси
Оксид алюминия	Специфический, гетерополярный	Пористый		Сложные смеси углеводородов Сорбент используется редко

Таблица 4. Полимерные адсорбенты для газо-адсорбционной хроматографии

Адсорбент	Матрица	Величина удельной поверхности, м ² /г	Полярность	Область применения
Хромосорб 101	Стирол-ДВБ	30-40	Неполярная	Разделение простых и сложных эфиров, спиртов, кетонов, альдегидов, гликолей
Хромосорб 102	«	300-400	«	Разделение постоянных газов, низкомолекулярных соединений и кислородсодержащих соединений, воды
Порапак Р	«	100-200	«	Разделение различных классов карбонильных соединений, гликолей, спиртов
Хромосорб 103	Полистирол	15-25	Неполярная основная	Разделение основных соединений, аминов, амидов, гидразинов, спиртов, кетонов
Хромосорб 104	Акрилонитрил-ДВБ	100-200	Сильнополярная	Разделение нитрилов, нитропарафинов, винилхлорида, ксилолов, NH ₃ , SO ₂ , CO ₂ , микроколичеств воды
Хромосорб 107	Полиакрилат с сетчатой структурой	400-500	Среднеполярная	Определение формальдегида, разделение серусодержащих газов
Хромосорб 108	«	100-200	Слабополярная	Разделение газов и полярных соединений (воды, спиртов, альдегидов, кетонов, гликолей)
Порапак N	Стирол-ДВБ с винилпирролидоном	250-350	Среднеполярная	Определение формальдегида, разделение NH ₃ , CO ₂ и воды, определение C ₂ H ₂ в углеводородах
Порапак R	«	450-600	Слабополярная	Разделение простых и сложных эфиров, нитрилов, ниторсоединений, HCl, Cl ₂ , H ₂ O

Применение для решения экологических задач. Метод газодсорбционной хроматографии обычно используют для оценки содержания в атмосферном воздухе кислорода, водорода, метана, углекислого газа, окиси углерода, окислов азота, хлора, диоксида серы, сероводорода и сероуглерода. Детекторы, используемые для этой цели приведены в табл. 5.

Таблица 5. Характеристики хроматографических детекторов, используемых в анализе газов

Детектор	Анализируемые газы	Нижний предел детектирования, пг	Число порядков линейного диапазона ГГ
Катарометр	Любые газы	10 нг	4
ПИД	Органические газы	100	6
ФИД	Органические газы*	20	7
ТИД	Азот- и фосфорсодержащие	1-10	3-4
ЭЗД	Галоген-, серу- и азотсодержащие	0,001-1,0	2
ПФД*	Серу- и фосфорсодержащие	100	3-4
ХЛД*	Серусодержащие	2	6

* Кроме формальдегида и углеводов C₁-C₂; все неорганические газы, кроме O₂, N₂, CO, CO₂ и SO₂.

** ПФД –пламенно-фотометрический детектор; ХЛД – хемилюминесцентный детектор

Достигаются весьма низкие пределы обнаружения соединений, соответствующие ПДК, которые показаны в табл.6. Областью применения этого метода также является анализ выхлопных газов двигателей и оценка загрязнения атмосферы выхлопными газами, определение углеводов C₁-C₄. Возможно определение примесей в газообразных углеводородах,

Таблица 6. Легколетучие органические соединения, загрязняющие воздух

Класс соединений	Индивидуальные вещества	ПДК, мг/м ³	Варианты детектирования
Альдегиды	Акролеин	0,03	ПИД, МС
	Формальдегид	0,035	
Кетоны	Капроновый альдегид	0,02	ПИД, ТИД, МС
	Ацетальдегид	0,01	
	Бензальдегид	0,02	
	Ацетон	0,35	
	Метилэтилкетон	0,1	
Ароматические углеводороды	Бензол	1,5	ПИД, ТИД, МС ПИД ТИД, МС ПИД, МС
	Метилбензолы	0,01-0,03	
	Нитробензол		
	Толуол	0,6	
	Нитротолуолы		
	Ксилолы	0,2	
	Стирол	0,04	
	Изопропилбензол	0,01	
	Нафталин	0,003	
	Антрацен		
Хлоруглеводороды	Дибензофуран		ПИД, ЭЗД, МС ЭЗД, МС
	Хлороформ	0,03	
	1,2-Дихлорэтан	3	
	Метилхлороформ		
	Трихлорэтилен	4	
	Тетрахлорэтилен	0,5	
	1,1,1-Трихлорэтан	2	
	Тетрахлорид углерода	4	
Фреоны	Трифторхлорметан (фреон 11)	100	ПИД, МС
	Дифтордихлорметан (фреон 12)	100	
	Трифлортрихлорметан	8	
Спирты	Метанол	1	ПИД, МС
	Этанол	5	
	Изобутанол	0,1	
Олефины	Пентены		ПИД, МС
	Гексены	0,4	
Эфиры	Этилацетат	0,1	ПИД, МС
	Бутилацетат	0,1	
	Жирные кислоты C ₂ -C ₅		
Кислоты	Жирные кислоты C ₂ -C ₅	60-200	ПИД, МС
	Предельные углеводороды		
Амины	Метиламин		ТИД, МС
	Этиламин		
	Диэтиламин		
	Триэтиламин		
	Этилмеркаптан	3.10 ⁻⁵	
Сернистые соединения	Изопропилмеркаптан	1.10 ⁻⁴	Катарометр
	Диметилсульфид	0,08	
	Диметилдисульфид	0,7	
	Сероводород	0,008	
	Диоксид серы	0,5	
Неорганические газы	Оксид углерода	5	Катарометр
	Оксид азота	0,4	
	Диоксид азота	0,085	
	Фенол	0,01	
Фенолы	Крезолы		ПИД, МС

например, метана в этилене. Газоадсорбционная хроматография является удобным методом определения в воздухе низких (до 0,03 мкг/л) таких токсичных газов, как фосфин и арсин без предварительного концентрирования с использованием ТИД или ФИД. Возможно определение в воздухе таких токсичных и реакционноспособных соединений, как H_2S , SO_2 , COS и меркаптанов.

Еще одной сложной задачей является определение винилхлорида в воздухе. Для отделения этого соединения от других используют насадочные колонки, заполненные углеродными адсорбентами Карбопаком С и Порапаком S и Т. Для детектирования винилхлорида можно использовать несколько достаточно чувствительных детекторов: ПИД, ЭЗД, ФИД, МС, ЭЛКД. Лучшей чувствительностью обладают МС и ЭЛКД и с их применением можно определить до 10^{-12} г винилхлорида. На практике обычно используют ПИД, который позволяет определить 10^{-10} г винилхлорида, для повышения чувствительности ГХ-определение сочетают с предварительным сорбционным концентрированием. Для надежной идентификации винилхлорида используют ГХ/МС или реакционно-сорбционное концентрирование примесей, заключающееся в удалении основной массы мешающих анализу примесей ЛОС непосредственно в процессе отбора пробы в форколонке, заполненной цеолитом 5Å, концентрированной серной кислотой на силикагеле и полиамидным эластомером (версамидом 900). После форколонки ставят ловушку с активированным углем. Винилхлорид не реагирует с насадкой форколонки и углем и без изменения концентрации регистрируется детектором газового хроматографа. Определение винилхлорида в воздухе с использованием этого приема показано на рис. 7.

Широкие возможности для определения полярных, летучих соединений (этаноламинов, пиридина, анилина, толуидина) дает применение полимерного сорбента с низкой удельной поверхностью

Тенакс-ГС на основе поли-(2,6-дифенил-*n*-фениленоксида). Его отличает отсутствие необратимых взаимодействий с полярными соединениями, устойчивость по отношению к воде и кислороду.

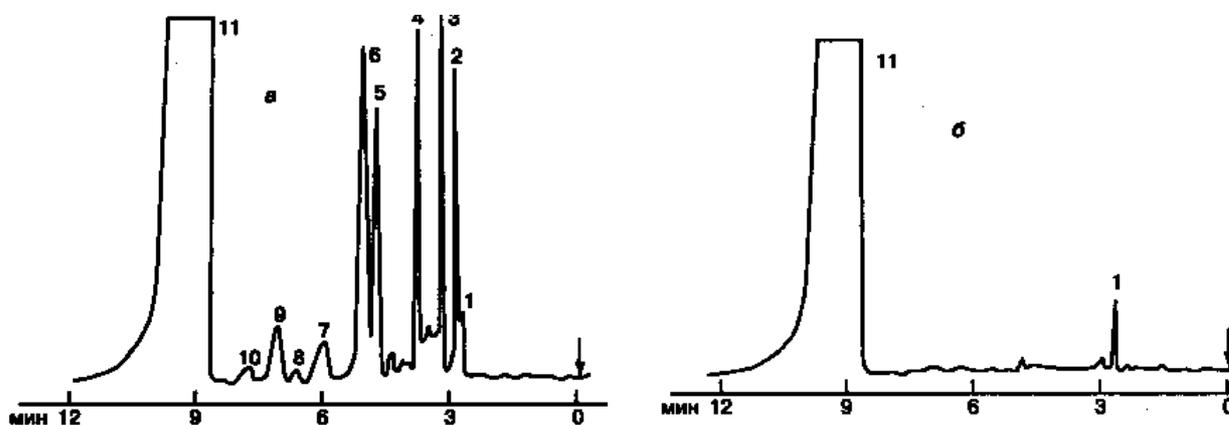


Рис. 7. Идентификация винилхлорида в смеси ЛОС, выделяющихся в воздух рабочей зоны при производстве искусственной кожи на основе ПВХ:
а – обычном варианте; **б** – после пропускания воздуха через форколону с цеолитом 5А и серной кислотой. 1 – винилхлорид; 10 – толуол (экстрагент); пики 2-10 не идентифицировались.

2.2. Газо-жидкостная хроматография

На практике чаще используют газо-жидкостную хроматографию, благодаря многообразию неподвижных фаз. В газо-жидкостной хроматографии разделение компонентов пробы достигается за счет многократного повторения процессов распределения между движущейся газовой и неподвижной жидкой фазами. Скорость миграции компонентов зависит от их летучести и способности растворяться в стационарной жидкой фазе. Компоненты с низкой растворимостью в жидкой фазе и наибольшей летучестью при данной температуре продвигаются по колонке быстрее, и, наоборот, компоненты с низкой летучестью и высокой растворимостью в стационарной фазе обладают малой подвижностью. Чем больше подвижность, тем меньше время удерживания.

В качестве носителя неподвижной фазы используют адсорбенты с поверхностью 0,5-3,0 м²/г и с размером пор (0,5-1,5)10⁻³ мм. Наиболее часто используют диатомитовые носители, стеклянные шарики, силикагель и политетрафторэтилен.

Неподвижные фазы должны быть химически и термически стабильны, смачивать носитель и наноситься на его поверхность равномерной пленкой. Известно более тысячи неподвижных жидких фаз, достаточно часто используется около 100. По химическому составу неподвижные фазы делят на следующие классы:

Углеводороды (предельные углеводороды, смеси предельных и непредельных углеводородов, ароматические углеводороды)

Примеры: сквалан, парафиновое масло, апиэзоновые смазки, алкилнафталины, полифениловый эфир

Силоксаны с радикалами различной полярности (неполярными, среднеполярными и полярными)

Примеры: метилсилоксан, метилфенилсилоксан, нитрилсилоксан, полиэфирсиликоны

Эфиры простые и сложные, полиэфиры, полигликоли

Фталаты и фосфаты

Выбор неподвижной фазы зависит от полярности разделяемых соединений и от их способности образовывать водородные связи. Для разделения полярных сорбатов необходимы полярные неподвижные фазы, неполярных – неполярные. Понятие **полярности** объединяет свойства, обуславливающие селективность за счет физического взаимодействия молекул с функциональными группами. Учитывается сумма неразрывно связанных взаимодействий, например, взаимная ориентация диполей, индуктивные и дисперсионные силы, образование водородных мостиков.

Полярность рассчитывают как сумму этих взаимодействий, вклад которых оценивается по разнице индексов удерживания стандартных

веществ на наименее полярной фазе (сквалан, $I=0$) и наиболее полярной (β,β' -оксидипропионитрил, $I=100$). Например, по системе Роршнайдера:

$$P = (X + Y + Z + U + S)/5 \quad (11), \text{ где}$$

$X = \Delta I_{\text{бензол}}$ – индукционные взаимодействия,

$Y = \Delta I_{\text{бутанол}}$ - протон-донорные и протон-акцепторные взаимодействия,

$Z = \Delta I_{\text{нитропропан}}$ – диполь-дипольные взаимодействия,

$U = \Delta I_{\text{пентанон-2}}$ - диполь-дипольные взаимодействия,

$S = \Delta I_{\text{пиридин}}$ – протон-акцепторные взаимодействия.

В газо-жидкостной хроматографии разница в удерживании определяется и неспецифическими, и специфическими взаимодействиями. Неполярные соединения обычно разделяются в соответствии с температурами их кипения. В случае неполярной неподвижной фазы полярные соединения удерживаются существенно меньше, чем неполярные, кипящие при той же температуре. Удерживание полярных соединений увеличивается по мере роста полярности неподвижной фазы, и, наоборот, время удерживания соединений возрастает с уменьшением полярности неподвижной фазы.

В табл. 7 приведены неподвижные фазы, применяемые для разделения соединений различных классов.

Применение для решения экологических задач. Метод применяется для определения широкого круга соединений в атмосферном воздухе и воздухе жилых и производственных помещений, различных водах и почве. Наиболее важными классами определяемых соединений являются

Таблица 7. Неподвижные фазы, применяемые для разделения соединений различных классов

Класс соединений	Неподвижная фаза
Алкалоиды	Силиконы E-30, F-1
Амины алифатические	Карбовакс 400 + КОН
Амины ароматические	Карбовакс 400 + КОН
Аминокислоты	Силиконы OV-1, OV-101
Эфиры жирных кислот	Нитрилсиликоны
Полихлорированные бифенилы	Метилфенилсиликоны
Полициклические ароматические углеводороды	Метилфенилсиликоны
Гербициды	Метилсиликоны
Инсектициды	Силиконы SE-30, SE-54
Спирты C ₁ -C ₅	Карбовакс 1500
Пестициды	Силиконы SE-30, SE-50
Фенолы	Силиконы, SP-1000
Углеводороды	Апиезоны L, M, силикон E-52
Эфиры	Силиконы, карбоваксы
Металлорганические соединения	Силиконы

нефтепродукты, диоксины, полихлорированные бифенилы, амины, хлорированные углеводороды, металлорганические соединения, полициклические ароматические углеводороды и пестициды.

Выбор как неподвижной фазы, так и детектора, определяется природой вещества. На рис. 8 показано разделение смеси летучих фенолов методом газо-жидкостной хроматографии.

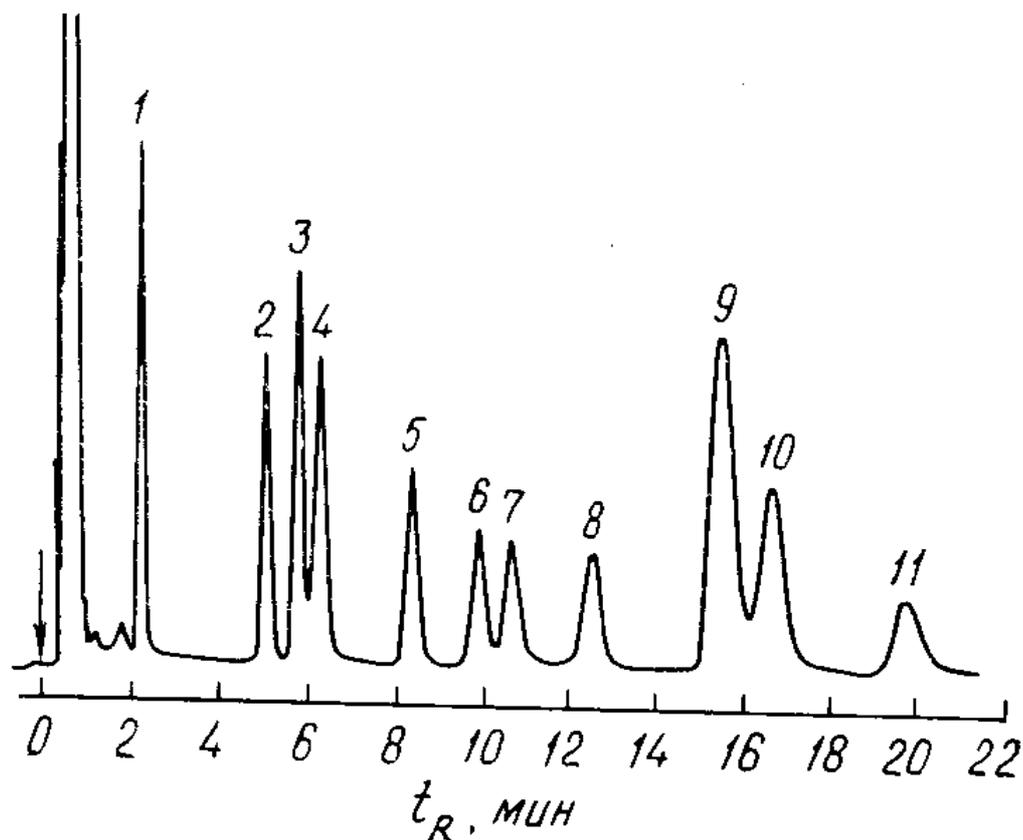


Рис. 8. Разделение фенолов методом газо-жидкостной хроматографии: 1-фенол, 2-*o*-крезол, 3- *m*-крезол, 4-*n*-крезол, 5-*o*-этилфенол, 6-*m*-этил фенол, 7-*n*-этилфенол, 8-2,6-диэтилфенол, 9-2,4+2,6-диметилфенол, 10-2,3+3,5-диметилфенол, 11-3,4-диметилфенол

Неподвижная фаза: карбопак G+0,1% SP-1000; температура колонки 225⁰C

2.3. Капиллярная газовая хроматография

Широкое многообразие используемых жидких неподвижных фаз определяет успех разделения большого количества соединений различной природы. Однако одно лишь изменение природы неподвижной фазы и связанное с этим изменение ее растворяющей способности не может обеспечить успех разделения во всех случаях. При разделении сложных смесей компонентов с близкими химическими и физическими свойствами и смесей, состоящих из большого числа разнообразных веществ, на первый план выдвигаются повышенные требования к качеству работы хроматографической колонки. Этим требованиям отвечают капиллярные

колонок без носителя, когда пленка неподвижной фазы наносится на внутреннюю поверхность капилляра. Этот тип колонок, предложенный Голеем в 1957 году, обеспечивает значительно большую эффективность разделения по сравнению с обычными насадочными колонками. Математическое описание процесса миграции конечной по протяженности зоны вещества в бесконечно длинной трубке базируется на следующих положениях:

- реализуется ламинарное течение газа-носителя;
- неподвижная фаза фиксирована на внутренней стенке капилляра в виде гомогенной жидкой пленки;
- распределение скоростей в потоке вязкой среды в трубке круглого сечения имеет параболический характер;
- у оси потока скорость максимальна, а непосредственно вблизи стенок скорость перемещения среды равна нулю.

Движение газа-носителя в колонках без наполнителя сопровождается значительно меньшими энергетическими потерями, чем в заполненных пористым материалом трубках с той же величиной свободного сечения. Отсутствие заполнения позволяет улучшить на два и более порядка эффективность колонки.

Для приготовления капиллярных колонок используют стеклянные, кварцевые или металлические трубки, которые должны удовлетворять следующим требованиям:

- капилляр должен иметь нужную длину и постоянный диаметр по всей длине, причем эти параметры не должны изменяться под действием температуры и давления;
- внутренняя поверхность капилляра должна быть химически однородной, на ней не должно быть больших трещин и пор;
- поверхность должна адсорбировать сорбаты, жидкие неподвижные фазы и газ-носитель в минимальной степени;

- поверхность должна прочно и равномерно смачиваться неподвижной фазой, т.е. на поверхности должен быть гомогенный разделяющий слой неподвижной фазы;
- капилляры должны обладать необходимой механической прочностью.

Приготовление колонки состоит из ряда этапов: изготовления капилляра; подготовки внутренней поверхности капилляра – травлением или дезактивацией; нанесения неподвижной фазы; кондиционирования и испытания капиллярной колонки.

Для того чтобы достичь высокой разделяющей способности колонок, на внутренние стенки капиллярной трубки должна быть нанесена однородная равномерная пленка жидкости. В настоящее время используют два основных способа: динамический и статический. В случае первого внутренняя поверхность капилляра смачивается при пропускании через капилляр определенного объема раствора жидкой фазы в подходящем растворителе под действием повышенного давления какого-либо газа. Движущаяся по капилляру пробка раствора оставляет позади себя жидкую пленку, затем через капилляр пропускают инертный газ, в результате чего испаряется растворитель, и получается тонкая пленка неподвижной фазы. Статический способ заключается в том, что капилляр заполняется раствором неподвижной фазы и растворитель испаряется в условиях повышенной температуры или пониженного давления. Толщину разделяющего слоя следует выбирать исходя из того, что между подвижной газовой фазой и разделяющим слоем должен происходить интенсивный массообмен с тем, чтобы равновесие между ними устанавливалось достаточно быстро, и чтобы емкость колонки (она определяется количеством неподвижной жидкой фазы) была не слишком мала. Для увеличения емкости предложено фиксировать неподвижную фазу в тонком слое носителя, нанесенном на стенку капилляра.

Существует несколько типов капиллярных колонок:

1. Капиллярные колонки с пленкой жидкой неподвижной фазой (WCOT)
тонкая пленка неподвижной фазы нанесена непосредственно на внутреннюю поверхность колонки
толщина пленки 0,01-1 мкм;
внутренний диаметр и толщина стенок - п.10-п.100 мкм
2. Капиллярные колонки с пористым слоем, пропитанным жидкой фазой, (PLOT)
на внутренних стенках расположен слой носителя, несущего неподвижную фазу
толщина пленки 1 - 5 мкм
3. Капиллярные колонки с твердым носителем (ПКК-ТН или PLOT)
на внутренних стенках напылен слой твердого носителя
толщина пленки 10 мкм
4. Капиллярные колонки с химически привитой неподвижной фазой

Отличия капиллярных колонок по своим характеристикам от насадочных определяют специфические особенности газохроматографической аппаратуры для работы с ними. Такими особенностями являются малые объемы вводимых проб, невысокие значения расхода газа-носителя и высокие скорости изменения концентрации при элюировании передних и задних фронтов хроматографических пиков. Это обуславливает тот факт, что все соединения капиллярных колонок с другими элементами прибора должны быть выполнены так, чтобы объем возникающих при этом полостей был минимальным.

Особенности капиллярной хроматографии предъявляют весьма жесткие требования к детекторам. Они должны обладать высокой чувствительностью и скоростью регистрации сигнала и иметь небольшой

объем измерительной камеры. В наибольшей степени удовлетворяет всем требованиям пламенно-ионизационный детектор.

Применение для решения экологических задач. Капиллярная хроматография позволяет решать целый ряд сложных аналитических задач, в том числе различать вещества, отличающиеся на 2-3 единицы молекулярной массы, проводить анализ биологических жидкостей на содержание стероидных гормонов, определять состав душистых веществ, контролировать содержание ароматических углеводородов в объектах окружающей среды.

Газохроматографический метод определения содержания керосина в почвах и водах и воздухе. Впервые капиллярная хроматография была применена для анализа смеси углеводородов, и метод нашел широкое применение при анализе бензинов, керосинов, продуктов переработки каменного угля и т.д.

Загрязнение почв, грунтов и водных объектов и воздуха углеводородами происходит фактически повсеместно. Источниками нефтепродуктов в большинстве случаев являются моторные топлива и смазочные масла, необходимые для работы транспортных средств. Допустимая концентрация нефтепродуктов (бензин нефтяной) в воздухе составляет $1,5 \text{ мг/м}^3$, а в воде водоемов $0,1 \text{ мг/л}$.

Важной экологической проблемой является контроль загрязнения почвы, поверхностных вод и воздуха различными видами топлива. Наиболее распространенными топливами в авиа и космической промышленности являются керосиновые фракции нефти (150°C - 280°C), к таким относятся керосины. Реактивное топливо на 98-99% состоит из углеводородов (главным образом это C_8 - C_{16}), содержание ароматических углеводородов не превышает 20-25%, непредельных – 2-5%. Наиболее распространенным методом анализа этих видов топлив является газовая хроматография в варианте газо-жидкостной хроматографии с

использованием среднеполярных неподвижных фаз – силиконов SE-30, OV-17 и других. Поскольку топлива представляют собой сложные смеси углеводородов для их разделения необходимо использовать капиллярные колонки, обладающие высокой эффективностью. Метод газожидкостной хроматографии на капиллярных колонках с пламенно-ионизационным детектором позволяет, как идентифицировать тип топлива, загрязняющего почвы и воды, так и оценить его содержание. На рис.9. показаны стандартные хроматограммы различных нефтепродуктов.

Прежде всего, необходимо установить тип нефтепродукта, поскольку их состав может быть очень разным. Задачу идентификации топлив для установления источника загрязнения объектов окружающей среды можно решать, используя прием, названный методом “отпечатков пальцев”. Идентификация в этом случае сводится к выявлению в анализируемой пробе отдельных пиков индивидуальных компонентов топлива, либо группы компонентов без детального отнесения индивидуальных пиков, либо того и другого. При этом в качестве индивидуальных компонентов более рационально выбирать члены гомологического ряда *n*-парафинов, а группы компонентов – это нафтеновые и ароматические углеводороды, пики которых регистрируются между пиками *n*-парафинов (C₇-C₁₀). Для обнаружения того или иного топлива важно как общее количество пиков на хроматограмме, так и их расположение относительно пиков *n*-парафинов, и, кроме того, соотношение высот пиков различных компонентов.

После установления типа топлива по общему виду хроматограммы проводят оценку содержания топлива. Готовят градуировочные смеси, наиболее целесообразно использовать смеси *n*-парафинов (C₇-C₁₂) в гексане и хроматографируют их. По отношению суммы площадей

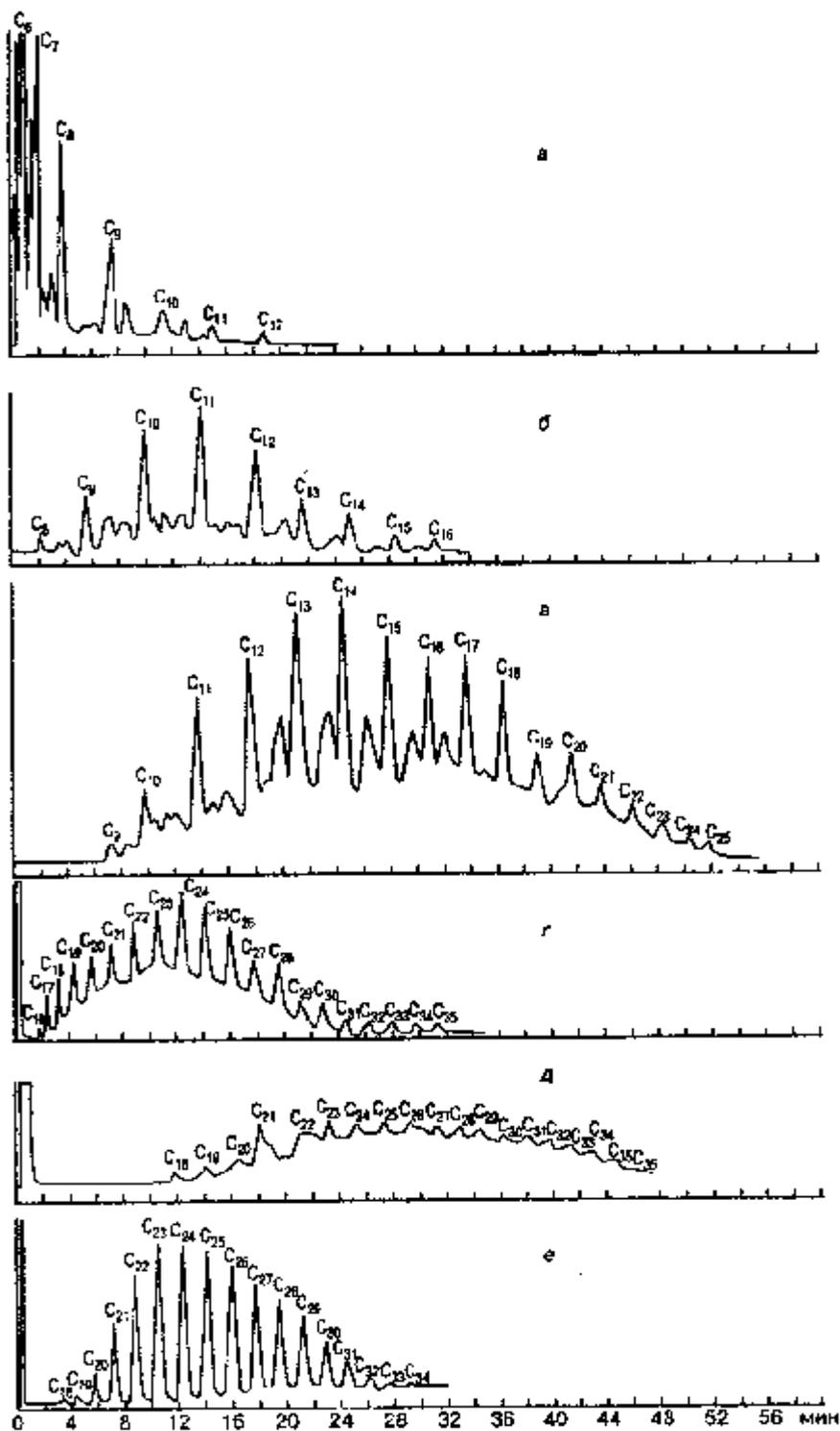


Рис. 9. Хроматограммы стандартных образцов различных образцов нефтепродуктов. Колонка стальная (1800x3 мм), заполненная хромосорбом W-AW с 3% Дексила 400. Пределы программирования температуры колонки: а) бензин А-76, 45-150⁰С; б) керосин осветительный, 60-200⁰С; в) дизельное топливо «Л», 60-250⁰С; г) консистентная смазка, 200-330⁰С; д) топочный мазут марки «40», 150-330⁰С; е – технический парафин, 200-300⁰С. Скорость программирования 4 град/мин

n-парафинов (либо площади пика *n*-парафина, выбранного в качестве эталона) на хроматограммах исследуемого образца и стандартной смеси рассчитывают содержание топлива в анализируемом объекте.

Одной из важных задач является **определение летучих органических соединений (ЛОС)** в воздухе, воде и почве. Наиболее опасными загрязнителями среди ЛОС являются различные хлоруглеводороды, некоторые из них приведены в табл 8. Для разделения используют самые разнообразные жидкие неподвижные фазы, наиболее чувствительными являются ЭЗД, ЭЛКД и МС. Хроматограмма определения ЛОС в воде по методике ЕРА приведена на рис. 10. Для повышения надежности идентификации компонентов смеси и повышения чувствительности галогенсодержащих соединений использовали второй детектор (электролитический кондуктометрический детектор).

Помимо ЛОС, вода и почва может загрязняться и органическими соединениями средней летучести. К ним относятся анилины и нитроароматические соединения. Они разделяются на капиллярных колонках с силиконовыми неподвижными фазами при использовании в качестве детектора ТИД и МС после извлечения твердофазной экстракцией. Разделение проводится в режиме программирования температуры. Предел обнаружения равен 0,025 мкг/л для анилина и 0,05 мкг/л для ароматических нитросоединений.

Сложной и важной задачей является **определение пестицидов** (табл. 9). По стандартам ЕС суммарное содержание пестицидов не должно превышать 0,5 мкг/л, причем концентрация каждого отдельного вещества не должна быть выше 0,1 мкг/л. Такая чувствительность определения достигается лишь после концентрирования определяемых компонентов. Газохроматографическое определение пестицидов в водах проводится после твердофазной экстракции, в почвах – после извлечения экстракцией

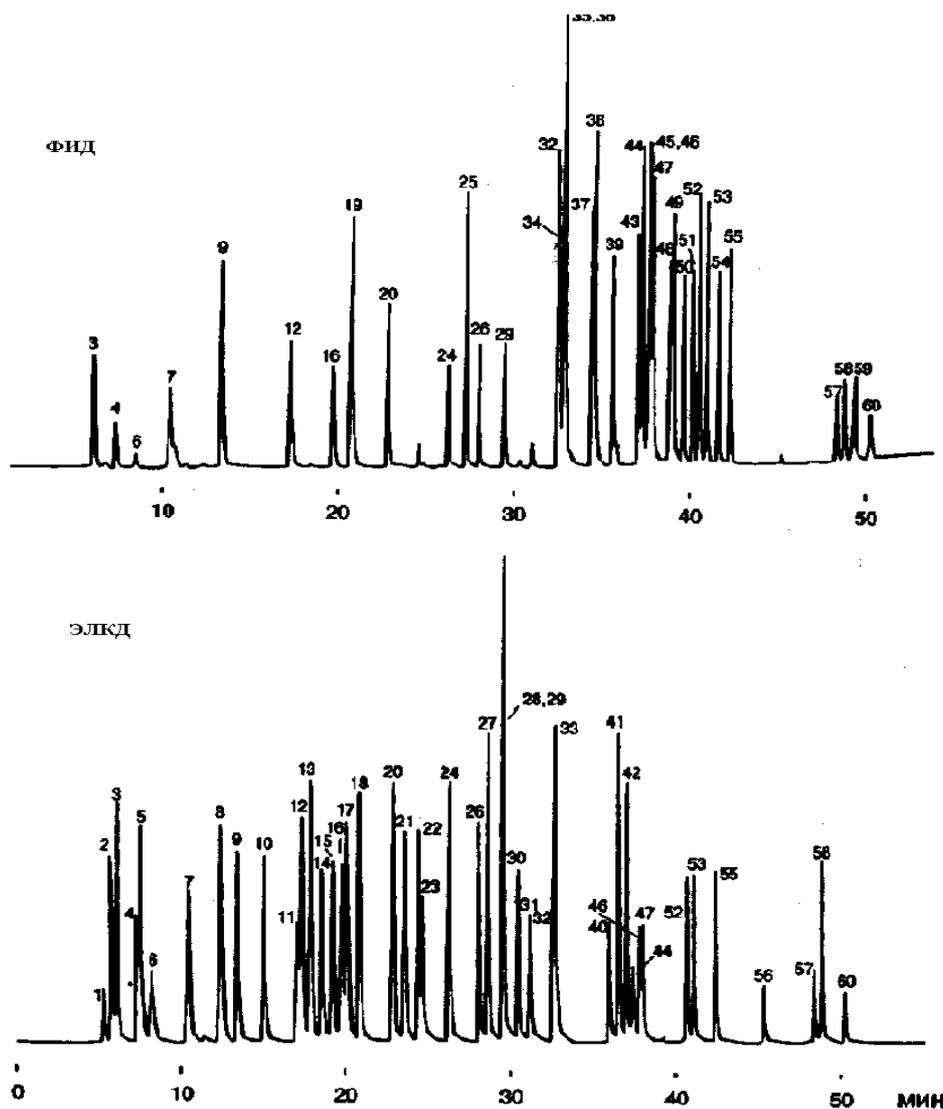


Рис. 10. Хроматограмма растворенных в воде летучих органических соединений: 1 – дихлордифторметан; 2 – хлорметан; 3 – метилхлорид; 4 – бромэтан; 5 – хлористый этил; 6 – трихлорфторметан; 7 – 1,1-дихлорэтилен; 8 – дихлорметан; 9 – *транс*-1,2-дихлорэтен; 10 – 1,1-дихлорэтан; 11 – 2,2-дихлорпропан; 12 – *цис*-1,2-дихлорэтен; 13 – хлороформ; 14 – бромхлорметан; 15 – 1,1,1-трихлорэтан; 16 – 1,1-дихлорпропен; 17 – четыреххлористый углерод; 18 – бензол; 19 – 1,2-дихлорэтан; 20 – трихлорэтен; 21 – 1,2-дихлорпропан; 22 – бромдихлорметан; 23 – дибромметан; 24 – *цис*-1,3-дихлорпропен; 25 – толуол; 26 – *транс*-1,3-циклопропен; 27 – 1,1,2-трихлорэтан; 28 – 1,3-дихлорпропан; 29 – тетрахлорэтен; 30 – дибромхлорметан; 31 – 1,2-дибромэтан; 32 – хлорбензол; 33 – этилбензол; 34 – 1,1,1,2-тетрахлорэтан; 35 – *м*-ксилол; 36 – *п*-ксилол; 37 – *о*-ксилол; 38 – стирол; 39 – изопропилбензол; 40 – бромформ; 41 – 1,1,2,2-тетрахлорэтан; 42 – 1,2,3-трихлорпропан; 43 – пропилбензол; 44 – бромбензол; 45 – 1,2,3-триметилбензол; 46 – 2-хлортолуол; 47 – 4-хлортолуол; 48 – *трет*-бутилбензол; 49 – 1,2,4-триметилбензол; 50 – *втор*-бутилбензол; 51 – *н*-изопропилтолуол; 52 – 1,3-дихлорбензол; 53 – 1,4-дихлорбензол; 54 – *н*-бутилбензол; 55 – 1,2-дихлорбензол; 56 – 1,2-дибром-3-хлорпропан; 57 – 1,2,4-трихлорбензол; 58 – гексахлорбутадиен; 59 – нафталин; 60 – 1,2,3-трихлорбензол

Таблица 8. Летучие органические соединения, загрязняющие окружающую среду

Класс соединений	Индивидуальные вещества	Возможные варианты детектирования
Полициклические ароматические углеводороды	Нафталин Антрацен Фенантрен Хризен Бенз[а]антрацен Пирен Дибенз[а,h]антрацен Бензо[а]пирен Ацинафталин Ацинафтен Флуорен Флуороантен Бензо[к]флуороантен Бензо[ghi]пирилен Индено[1,2,3-cd]пирен Бензойная кислота <i>Трет</i> бутилбензойная кислота	ПВД, МС
Кислоты	Гидроксобензойные кислот	
Анилины	Бензиламин 2,4,5-Триметиланилин 2,4,6-Трихлоранилин 2,4-Дихлоранилин	
Фенолы	Фенол Крезолы Хлорфенолы Нитрофенолы	ЭЗД, МС
Полихлорированные бифенилы	2-Хлорбифенил 2,3-Дихлорбифенил 2,4,5-Трихлорбифенил 2,2',4,4'-Тетрахлорбифенил 2,2',3',4,6-Пентахлорбифенил 2,2',4,4',5,6'-Гексахлорбифенил 2,2',3,3',4,4',6-Гептахлорбифенил 2,2',3,3',4,5,6,6'-Октахлорбифенил	
Полихлорированные диоксины	Полихлорированные дибензо-п-диоксины Полихлордибензофураны	
Фталаты		

или термодесорбцией. Разделение выделенных пестицидов проводят на капиллярных колонках с силиконовой жидкой неподвижной фазой в режиме программирования температуры от 50 до 250⁰С. Для повышения надежности идентификации используют две колонки с неподвижными фазами разной полярности. Определение разделенных соединений проводят чаще всего с использованием ПИД или МС. Для селективной регистрации галогенсодержащих соединений используют ЭЗД или реже ЭЛКД, азот- и фосфорсодержащих соединений – ТИД, серосодержащих соединений – ПФД, для фосфорсодержащих соединений очень чувствительным является хемиллюминесцентный (ХЛД) детектор. Хроматограмма извлеченных из почвы остаточных количеств азот/фосфорсодержащих пестицидов приведена на рис. 11. Наиболее надежным и информативным является использование масс-спектрометрического детектора.

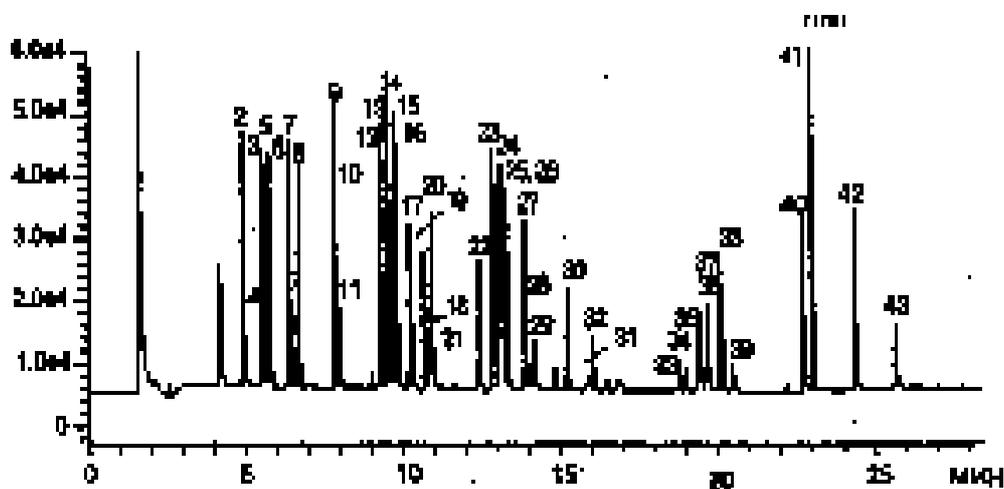


Рис. 11. Хроматограмма извлеченных из почвы остаточных количеств азот/фосфорсодержащих пестицидов: 1 - дихлофос, 2 - ЕРТС, 3 - бутилат, 4 - мевинфос, 5 - вернолат, 6 - пебулат, 7 - тебутирон, 8 - молинат, 9 - этопроп, 10 - циклоат, 11- хлорпропам, 12 - атратон, 13 - симазин, 14 - прометон, 15 -атразин, 16 – пропазин, 17 – тербуфос, 18 – пронамид, 19 – диазинон, 20 – дисульфотон, 21 – тербацил, 22 – метрибузин, 23 – симетрин, 24 – алахлор, 25 – аметрин, 26 – прометрин, 27 – тербутрин, 28 – бромацил, 29 – метолахлор, 30 – тридемефон, 31 – МЖК-264, 32 – дигенамид, 33 – стирофос, 34 – бутлахлор, 35 – фенамифос, 36 – напропамид, 37 – трициклазол, 38 – мерфос, 39 – карбоксин, 40 – норфлуразон, 41 – гексазинон, 42 – фенаримол, 43 –флуридон

Таблица 9. Классификация пестицидов, определяемых методом газовой хроматографии

Химический класс пестицидов	Наиболее важные представители	Детектор	C _{min} , мкг/л (МС)
Хлорсодержащие соединения ДДТ и метаболиты Гексахлорциклогексаны Циклодиены Полициклодиены	Инсектициды		
	2,4 -ДДТ, 2,4-ДДЕ, 2,4-ДДД	ЭЗД, МС	2
	Линдан	«	2
	Альдрин, диэльдрин	«	3
	Токсафен	«	
	Перметрин	«	
Фосфорсодержащие соединения	Инсектициды Паратион, диазинон, метамидофос	ПИД, МС	1-10
Азотсодержащие соединения			
Триазины	Гербициды: атразин, симазин	ТИД, МС	
		«	2
Производные фенилмочевины	Линурон, диурон, монурон		1-3
Карбаматы	Карбарил, метиокарб, промекарб		2
Прочие	Гербициды, фунгициды бентазон, метолахлор, метазахлор		
Оловоорганические соединения	Фунгицид – фентин	ПИД, МС	
Серосодержащие соединения	Гербицид – этофумесат	ПИД	

По аналогичной схеме образцы почвы и воды анализируют на содержание *полициклических ароматических углеводов, полихлорированных углеводов, полихлорированных бифенилов и полинитроуглеводородов.* Разделение проводят также в режиме

программирования температуры на капиллярных колонках, покрытых полисилоксанами. Для детектирования используют ПИД, ЭЗД и МС.

2.4. Реакционная газовая хроматография

В реакционной газовой хроматографии (РГХ) используются направленные химические превращения нелетучих соединений в летучие, а также неустойчивых в устойчивые. Используется *несколько вариантов РГХ*:

- химическое образование производных;
- пиролитическая РГХ (исследуемые вещества разлагаются при высоких температурах и затем хроматографически определяются образовавшиеся продукты);
- метод «вычитания» (мешающие компоненты поглощаются специфическими реагентами и не влияют на определение определяемых компонентов).

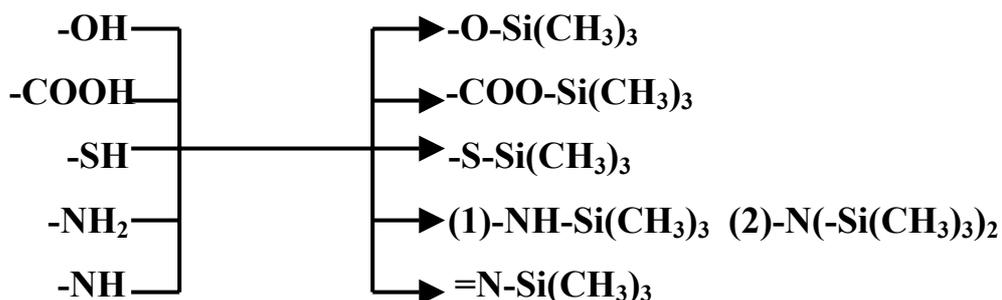
К положительным особенностям РГХ относятся: расширение области применения газовой хроматографии; улучшение разделения анализируемых соединений, т.к. индивидуальные свойства соединений более заметно проявляются в образующихся производных, чем в исходных соединениях; существенное улучшение количественных характеристик аналитических определений; увеличение чувствительности детектирования; лучшая сохранность хроматографической колонки.

Недостатками РГХ являются: усложнение анализа, ухудшение эффективности разделения, увеличение времени анализа.

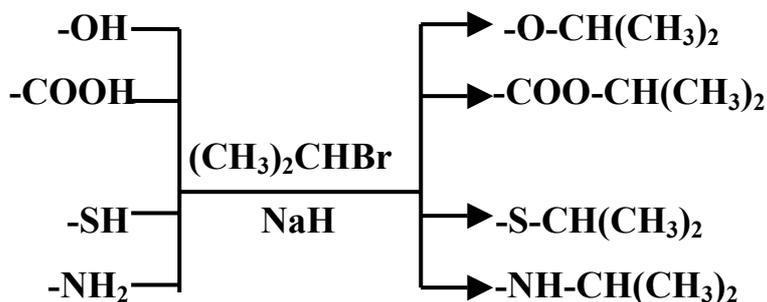
Наиболее широко применяется получение производных.

Основные способы получения производных перечислены ниже:

1. Получение силильных производных.



2. Алкилирование



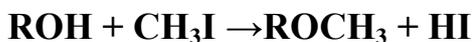
3. Получение сложных эфиров

На практике используют:

Диазометановый метод, где реакция дериватизации проходит по уравнению $\text{RCOON} + \text{CH}_2\text{N}_2 \rightarrow \text{RCOONCH}_3 + \text{N}_2$, *метанольный метод* — $\text{RCOON} + \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{RCOONCH}_3$ и *пиролитический метод* — $\text{RCOON} + (\text{CH}_3)_4\text{NOH} \rightarrow \text{RCOONCH}_3 + \text{H}_2\text{O} + (\text{CH}_3)_3\text{N}/$

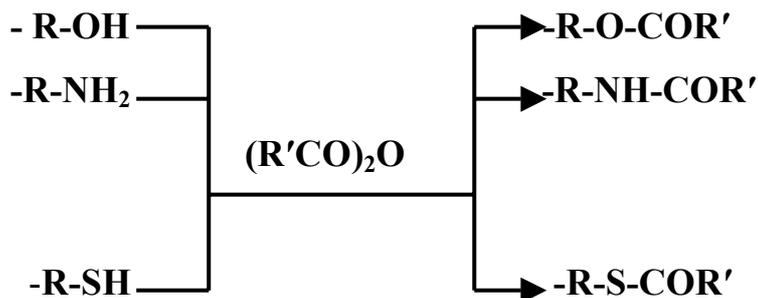
4. Получение простых эфиров

Дериватизация соединений проходит по уравнению:



5. Получение ацильных производных

На схеме представлены процессы дериватизации:



наиболее распространенные ацилирующие реагенты— ангидриды соответствующих кислот

6. Образование оксимов и гидразинов

7. Образование производных неорганических соединений (летучих хелатов металлов, алкилпроизводных ртути, гидридов, хлоридов).

Применение для решения экологических задач Реакционную газовую хроматографию применяют для определения различных классов загрязняющих веществ в воде, воздухе и почве:

– углеводороды: для определения ненасыщенных углеводородов.

Например, для определения алкенов с ЭЗД в виде бромпроизводных;

– карбонильные соединения: наиболее важно определение альдегидов и кетонов, которые являются приоритетными загрязнениями воздуха;

– фенолы и хлорфенолы: используют триметилсилильные производные фенолов, динитрофениловые эфиры и гептпфторбутирильные производные для определения фенолов, прежде всего в воде;

– спирты, карбоновые кислоты, оксиды и ангидриды кислот: предварительно эти ЛОС улавливают в сорбционных трубках, и после экстракции растворителем получают производные определяемых компонентов с селективными реагентами, наиболее значимо определение карбоновых кислот;

– амины и гидразины: применение РГХ позволяет избежать характерных для этих, очень полярных и реакционноспособных, соединений взаимодействий с неподвижной фазой и необратимой адсорбции, кроме того, повышается надежность их идентификации в сложных смесях с другими ЛОС;

– азотсодержащие ПАУ: решается важная задача их определения в твердых атмосферных частицах и дизельных выхлопах; производные ПАУ

превращают в ароматические амины, которые экстрагируют бензолом и ацилируют по реакции с гептафтормаслянным ангидридом, ЭЗД проявляет наибольшую чувствительность при определении производных;

– серусодержащие и фосфорсодержащие органические соединения: метод позволяет повысить чувствительность определения сероводорода после его превращения после реакции с карбидом кальция в ацетилен, а также информативность идентификации и чувствительность определения H_2S , COS , CS_2 , CH_3SH путем получения производных при фторировании газообразным фтором и последующей регистрации продуктов ЭЗД; метод позволяет обнаружить и идентифицировать метилфосфоновые кислоты в атмосферном воздухе после их превращения в метиловые эфиры;

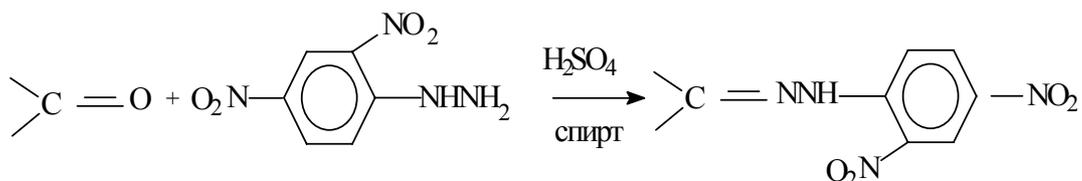
– галоидсодержащие органические соединения (пестициды, хлорметиловые эфиры, легкие хлоруглеводороды): повышается надежность их идентификации в сложных смесях;

– металлоорганические соединения: наиболее значимо определение алкильных производных ртути (метилртуть), олова и свинца, высокая чувствительность достигается при использовании элементоспецифического атомно-эмиссионного детектора;

– неорганические соединения: определение низких содержаний неорганических фторидов после их превращения в триметилфторсилан; хлора, хлористого водорода, аммиака, гидразина и азидов; оксида углерода путем гидрирования до метана (один из чувствительных вариантов его ГХ определения); идентификация и определение следовых количеств металлов в воздухе, воде, почве и донных отложениях в виде летучих хелатов.

Рассмотрим подробнее несколько наиболее важных примеров использования РГХ для определения экотоксикантов. Особенно важным для экологии является идентификация и определение низкокипящих альдегидов (формальдегид, акролеин, ацетальдегид), которые с выхлопными газами автомобилей попадают в атмосферный воздух. В

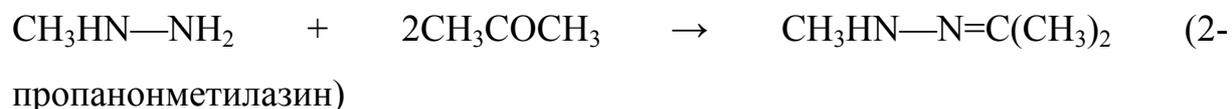
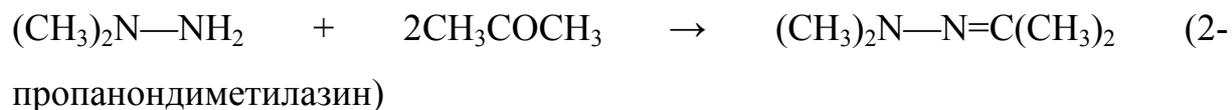
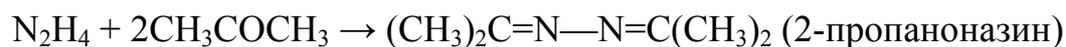
аналитической практике для этой цели чаще всего применяют РГХ. Для получения производных можно использовать два десятка различных реагентов, наиболее популярным является 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ), который превращается в гидразон по реакции:



Определение формальдегида основано на образовании 2,4-динитрофенилгидразона формальдегида и последующем его определении с ЭЗД или ПИД. При определении 0,02-0,5 мг/л формальдегида, относительная погрешность не превышает 14%.

Определение карбоновых кислот также наиболее удобно РГХ, их чаще всего определяют в виде метиловых эфиров. Другая возможность предполагает улавливание карбоновых кислот активным углем с последующим превращением в анилиды по реакции с анилином, либо в эфиры (как метиловые, так и этиловые), либо в пентафторбензиловые производные. Для разделения образующихся производных наиболее эффективны капиллярные колонки с силиконовыми жидкими неподвижными фазами и детектирование с ПИД.

РГХ также позволяет решить сложную экологическую задачу определения очень неустойчивых и токсичных гидразинов, относящихся к высокоэнергетическим пропеллентам ракетного топлива, в воздухе рабочей зоны или на пусковой площадке ракет. Воздух аспирируют через поглотитель с пористой пластинкой, содержащей ацетон. В результате реакции образуются ацетилпроизводные гидразинов:



Для разделения производных используют капиллярные колонки с силиконовыми неподвижными фазами и ТИД. Определение гидразинов можно проводить в интервале концентраций 1-10 мкмоль/л с относительным стандартным отклонением менее 0,05.

2.5. Хромато-масс-спектрометрия

Сочетание ГХ и масс-спектрометрии – один из наиболее эффективных методов анализа сложных смесей в объектах окружающей среды. Аналитические возможности ГХ и масс-спектрометрии идеально дополняют друг друга, и сочетание методов позволяет получать большой объем информации. На рис. 12 приведена схема компьютеризированной хромато-масс-спектрометрической установки, которая позволяет провести все стадии анализа самых сложных смесей органических веществ.

ГХ и МС присущи общие особенности – в обоих методах:

- анализ вещества проводится в газовой фазе;
- количество вещества, необходимое для одного анализа, составляет 10^{-6} г;
- скорости выполнения анализов в обоих методах могут быть согласованы таким образом, что в процессе элюирования одного хроматографического пика можно измерить несколько полных масс-спектров.

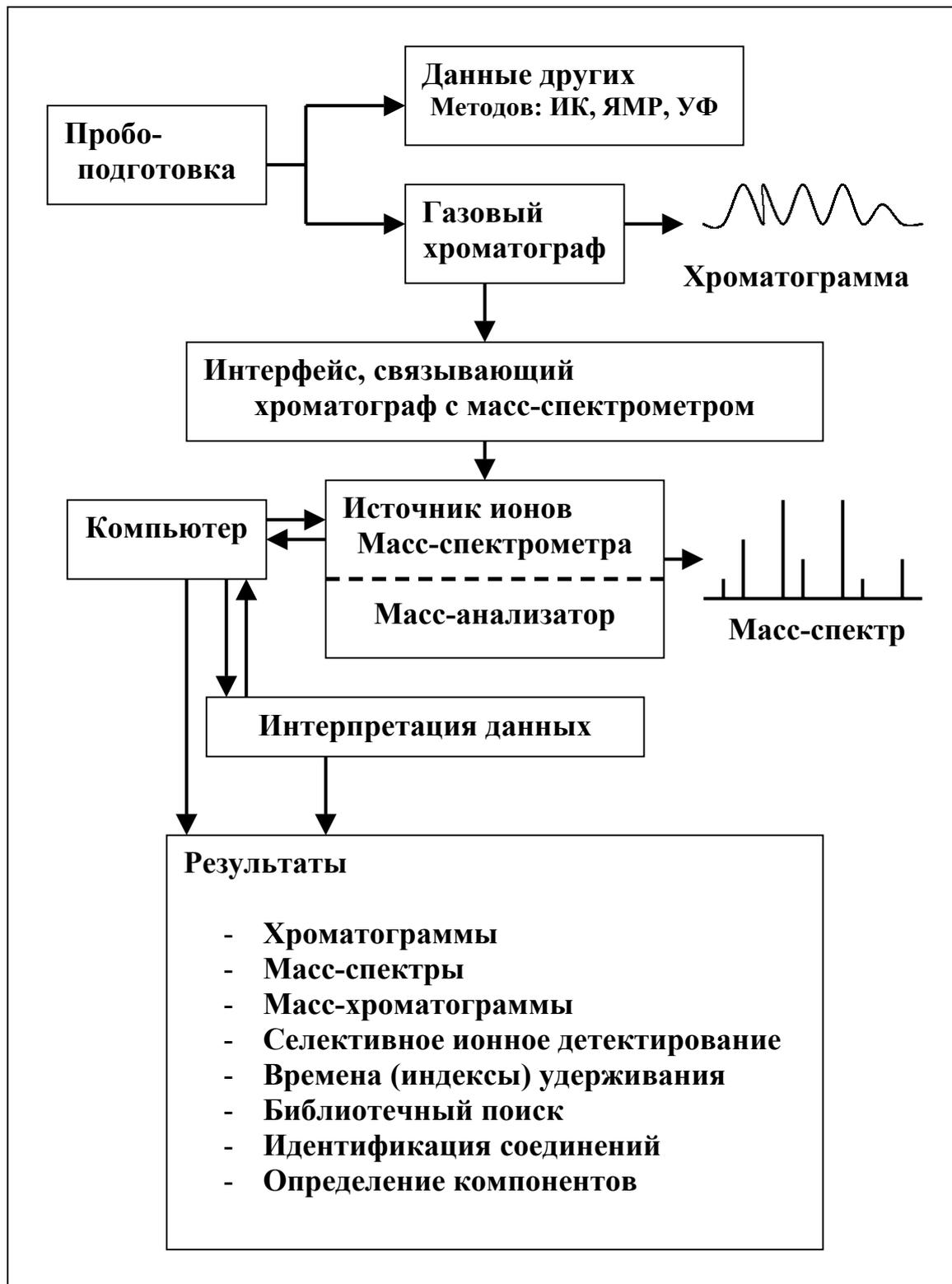


Рис.12. Основные элементы системы: газовый хроматограф – масс-спектрометр – компьютер

Различие состоит в том, что в ионном источнике масс-спектрометра поддерживается высокий вакуум (10^{-5} - 10^{-6} Па), тогда как давление в хроматографической колонке 10^5 Па. Для понижения давления используют молекулярный сепаратор, который одним концом соединен с хроматографической колонкой, а другим с ионным источником масс-спектрометра. Сепаратор удаляет из газового потока, выходящего из колонки, основную часть газа-носителя, а органическое вещество пропускает в масс-спектрометр. Давление при этом понижается до рабочего давления масс-спектрометра. Для этого используют следующие процессы массопереноса:

- эффузию через узкие поры и щели;
- диффузию в расширяющейся газовой струе;
- диффузию через полупроницаемые мембраны.

Эти процессы используются в эффузионном, струйном и мембранном молекулярных сепараторах, соответственно.

Для ионизации используют ионный удар, но более интересен другой способ ионизации – химическая ионизация. При этом способе источник ионов заполняется газом-реактантом, который ионизируется электронным ударом, а молекулы определяемых органических соединений превращаются в ионы за счет взаимодействия с ионами газа-реактанта или «медленными» электронами. Такая ионизация является «мягкой», то есть образовавшиеся ионы не разваливаются на мелкие фрагменты, а остаются в виде «молекулярного иона». Для ионизации лабильных органических соединений (в том числе биологически активных) разработаны специальные методы ионизации: ионизация в электроспрее (ESI) и ее подвид – химическая ионизация при атмосферном давлении (MALDI). Развитию хромато-масс-спектрометрии способствовало также создание «быстрых» квадрупольных масс-анализаторов.

Применение для решения экологических задач. Оснащенные современными компьютерами хромато-масс-спектрометры позволяют обнаружить в объектах окружающей среды множество химических веществ, в том числе, и токсичных. Впечатляющим примером достижений этого метода является его использование в работе космического аппарата, исследовавшего Марс с целью обнаружения жизни на этой планете. Масс-спектрометрическая установка выполнила анализ 14 образцов почвы с поверхности Марса. Никакой жизни обнаружено не было, несмотря на то, что предел обнаружения органических веществ составлял $10^{-7}\%$.

ГХ-МС широко используется для определения ЛОС в городском воздухе и воздухе рабочей зоны промышленных предприятий. Только с использованием этого метода можно получить детальную информацию о содержании приоритетных загрязнителей, к которым относятся ЛОС, в городском воздухе, их ПДК весьма низки и другие методы не могут справиться со столь сложной задачей.

Наиболее ярким примером, характеризующим возможности ГХ-МС, является определение полихлорированных дибензо-*p*-диоксинов и родственных им полихлордибензофуранов. В настоящее время хромато-масс-спектрометрия является практически единственным приемлемым методом для определения в объектах окружающей среды этих чрезвычайно токсичных веществ.

Сильное загрязнение поверхностных вод, попадание опасных соединений в подземные источники и водопроводную воду заставило экологов ужесточить контроль качества питьевой воды. Хромато-масс-спектрометрия – один из главных методов анализа воды, позволяющий идентифицировать большинство загрязнителей и определить их на уровне ПДК и ниже. На рис.13 показан один из примеров разделения сложной смеси веществ методом ГХ-МС, разделенные вещества и соответствующие им пики на хроматограмме показаны в табл.10. При контроле качества

воды наиболее важно определять ЛОС, диоксины, ПАУ, фенолы, пестициды. При определении ПАУ надежность их идентификации с помощью ГХ-МС не менее 80-95%, а чувствительность рутинных анализов составляет 0,1 мкг/л. При определении фенолов ГХ-МС их предварительно экстрагируют жидкостной или твердофазной экстракцией и затем переводят в ацетаты. Предел обнаружения фенолов и хлорфенолов составляет 5-20 нг/л. ГХ-МС относится к немногим методам, с помощью которых можно в сложной смеси органических загрязнений идентифицировать металлоорганические соединения (на фоне других ЛОС).

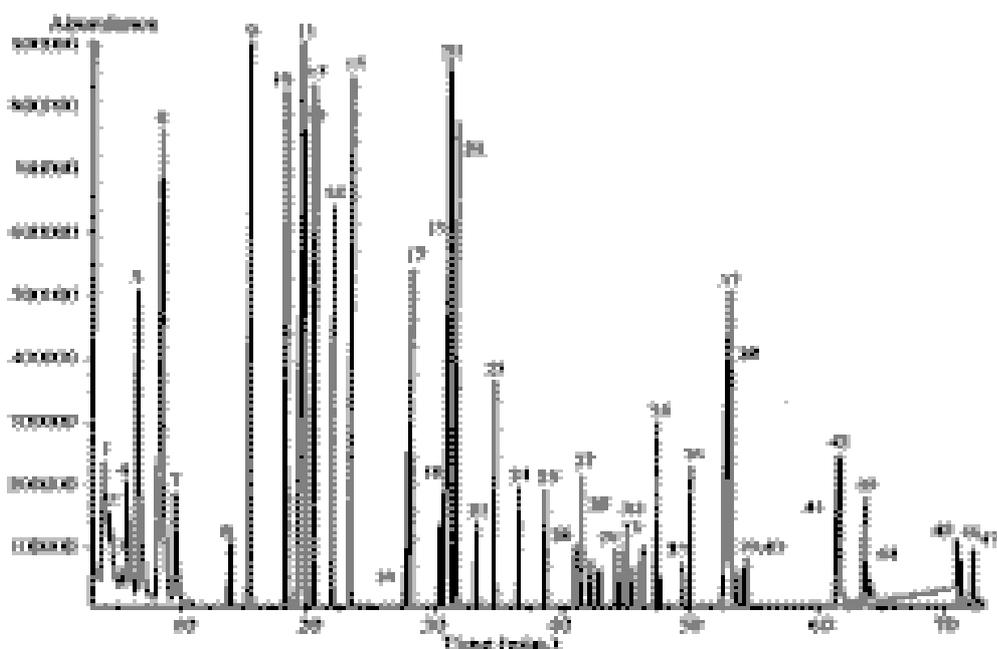


Рис. 13. Хроматограмма по полному ионному току смеси полициклических ароматических углеводородов, полихлорированных бифенилов, полинитроуглеводородов и хлорированных инсектицидов, экстрагированных из воды

Определяют металлоорганические соединения олова, свинца, ртути и других тяжелых металлов. Обычно эти соединения переводят в летучие производные и обнаруживают ГХ-МС с высокой чувствительностью.

Таблица 10. Перечень летучих соединений на хроматограмме, показанной на рис.13

№ пика	Соединение	№ пика	Соединение
1	1,4-Дихлорбензол	25	2,2',4,4'-Тетрахлорбифенил
2	1,3-Дихлорбензол	26	Не идентифицирован
3	Гексахлорэтан	27	Не идентифицирован
4	Нитробензол	28	2,2',3',4,6-Пентахлорбифенил
5	Изофорон	29	Флуорантен
6	Нафталин	30	Эндосульфан/хлордан
7	Гексахлорбутадиен	31	Endrin keton
8	Не идентифицирован	32	Не идентифицирован
9	Хлорнафтилен	33	2,2',4,4',5,6'-Гексахлорбифенил
10	Аценафтилен	34	Диэлдрин
11	Аценафтен	35	4,4'-ДДД
12	Аценафтилен-d ₁₀	36	4,4'-ДДТ
13	2-Хлорбифенил	37	Хризен
14	2,6-Динитротолуол	38	Бензо[<i>a</i>]антрацен
15	2,4-Динитротолуол	39	2,2',3,3',4,4',6-Гептахлорбифенил
16	α-НСН	40	2,2',3,3',4,5,6,6'-Октахлорбифенил
17	Гексахлорбензол	41	Бензо[<i>b</i>]флурантен
18	2,3-Дихлорбифенил	42	Бензо[<i>k</i>]флурантен
19	Фенантрен	43	Эндрин альдегид
20	Фенантрен-d ₁₀	44	Не идентифицирован
21	Антрацен	45	Бензо[<i>a</i>]пирен
22	Линдан	46	Дибензо[<i>a,k</i>]антрацен
23	2,4,5-Трихлорбифенил	47	Инден[123- <i>cd</i>]пирен
24	Гептахлор		

Например, C_n для триметилпропилсвинца и диэтилдипропилсвинца составляет 0,05 и 0,8 нг/л (s_r 0,018-0,032), предел обнаружения ртутьорганических соединений в биологических пробах составляет 0,2–1,4 нг/г. Единственной альтернативой в данном случае является ГХ с специфическим атомно-эмиссионным детектором.

Хромато-масс-спектрометрия относится к наиболее мощным методам анализа почв. Круг определяемых соединений и подходы к анализу аналогичны методикам, используемым в анализе вод.

3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография (ЖХ) - метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза в жидкостной хроматографии выполняет двойную функцию: 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии); 2) регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ. В ЖХ природа подвижной фазы имеет существенно большее значение. В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа, различных по составу, подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого числа встречающихся на практике задач. Метод ЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку большая часть веществ не обладает летучестью, а многие вещества неустойчивы при высоких температурах. В ЖХ разделение обычно происходит при комнатной температуре.

ЖХ подразделяется на варианты в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий:

– в ситовой хроматографии разделение компонентов осуществляется за счет разницы в растворимости молекул при их прохождении (фильтрации) через слой сорбента;

– в адсорбционной хроматографии – за счет разницы в адсорбируемости молекул, проходящих через слой частиц сорбента, покрытых неподвижной фазой в виде тонкого слоя или поверхностнопривитых радикальных групп;

– в ионообменной и ионной хроматографии – за счет разницы в способности к обмену ионами с ионообменниками;

Для анализа объектов окружающей среды наиболее широко используют ВЭЖХ в адсорбционном и ионообменном вариантах.

3.1. Молекулярная адсорбционная хроматография

В зависимости от природы подвижной (ПФ) и неподвижной (НФ) фазы различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографию. В нормально-фазовой ВЭЖХ НФ – полярная (чаще всего силикагель), а ПФ – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.). Удерживание веществ растет с увеличением их полярности. Разделения компонентов достигают, меняя элюирующую силу подвижной фазы, которая зависит от энергии взаимодействия компонентов ПФ с поверхностью НФ. В нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность ПФ увеличивается с ростом ее полярности.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами C_8 , C_{18}); ПФ – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Наименьшей элюирующей способностью обладает вода, а для повышения элюирующей способности в ПФ вводят ацетонитрил, метанол и другие растворители. Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы.

Подвижная фаза, прежде всего, должна растворять разделяемые компоненты. Основными характеристиками подвижных фаз являются ее элюирующая способность и селективность. Элюирующая способность подвижной фазы – это ее способность вступать в межмолекулярные взаимодействия с разделяемыми соединениями и группами на поверхности

сорбента. Эти взаимодействия способствуют десорбции разделяемых соединений, более быстрому перемещению хроматографических зон. Многократное увеличение гибкости метода ВЭЖХ достигается за счет применения в качестве подвижных фаз смесей растворителей. Принцип составления таких смесей прост. Необходимо взять два индивидуальных растворителя, один из которых имеет заведомо недостаточную элюирующую силу, а другой – заведомо избыточную, варьируя соотношение растворителей, можно получить нужную элюирующую способность. Под этим обычно имеют в виду, что на данном сорбенте данный сорбат будет иметь приемлемое значение фактора удерживания. Помимо элюирующей способности подвижная фаза должна обладать селективностью по отношению к компонентам разделяемой смеси. Селективность подвижных фаз связана с их способностью к специфическим взаимодействиям с сорбатами, определяемыми их структурными признаками. Благодаря разному характеру взаимодействий значение элюирующей способности по отношению к сорбатам различного строения будет отличаться, что и позволит их разделить. Селективность, как и элюирующая способность, определяется в первую очередь природой более сильного компонента смеси.

Элюотропные ряды являются простейшей формой *оценки силы индивидуальных растворителей*. Они дают количественную оценку адсорбционной способности растворителей в тех или иных вариантах хроматографического разделения. Элюотропный ряд – это перечень растворителей расположенных в порядке возрастания элюирующей способности, которая может быть охарактеризована различными параметрами. В качестве таких параметров используют:

– параметр адсорбционной силы растворителя ϵ^0 , который представляет собой относительную энергию взаимодействия молекул подвижной фазы с поверхностью адсорбента;

– параметр P' (параметр Снайдера), который рассчитывают как сумму логарифмов коэффициентов распределения стандартных веществ (этанола, диоксана и нитрометана) между паровой фазой и испытуемым растворителем;

– параметр S , который отражает чувствительность величин удерживания к изменению состава подвижной фазы. Эта величина предложена для ОФ ВЭЖХ.

Свойства растворителей, используемых в ВЭЖХ приведены в табл. 11.

Основой всех способов *классификации селективности* является различная способность растворителей вступать в межмолекулярные взаимодействия различных типов, представление интегрального параметра элюирующей силы в виде суммы парциальных величин, характеризующих протонодонорные, протоноакцепторные, диполь-дипольные и некоторые другие свойства растворителей. Снайдер разбил 81 исследованный растворитель на восемь классов, которые определенным образом располагаются в треугольнике селективности (рис. 14). Его вершинам отвечают гипотетические растворители, способные к взаимодействиям только одного типа: X_c – протонодонорным, X_d – протоноакцепторным и X_n – диполь-дипольным. Окружности в его пределах изображают области соответствующие реально существующим растворителям, поделенным на восемь групп селективности:

I – алифатические простые эфиры, амины; II – алифатические спирты; III – пиридины, тетрагидрофуран, амиды (кроме формамида); IV – гликоли, уксусная кислота, формамид; V – метиленхлорид, этиленхлорид; VI – алифатические кетоны и сложные эфиры, диоксан, сульфоны, нитрилы; VII – ароматические углеводороды, нитросоединения; VIII – фторированные спирты, вода, хлороформ.

Таблица 11. Свойства растворителей для ВЭЖХ

Растворитель	Предел прозрачности для УФ-света, нм	Элюирующая сила ε^0 на силикагеле	Параметр Р'	Параметр S	Группа селективности
Ацетонитрил	190	0,50	5,8	3,1	VI
Вода	-	1.50	10.2	0,0	VIII
Гексан	190	0,01	0,1	-	-
Диоксан	215	0,45	4.8	3,5	VI
Метанол	205	0,7	5,1	3.0	II
Метиленхлорид	233	0,32	3,1	-	V
Пропанол-2	205	0,55	3,9	4,2	II
Тетрагидрофуран	212	0.44	4,0	4,4	III
Толуол	285	0,1	2,4	-	VII
Триэтиламин	-	-	1,9	-	I
Уксусная кислота	-	-	6,0	-	VI
Хлороформ	245	0,26	4,1	-	VIII
Этанол	210	0,6	4,3	-3,6	II
Этилацетат	256	0,38	4,4	-	VI

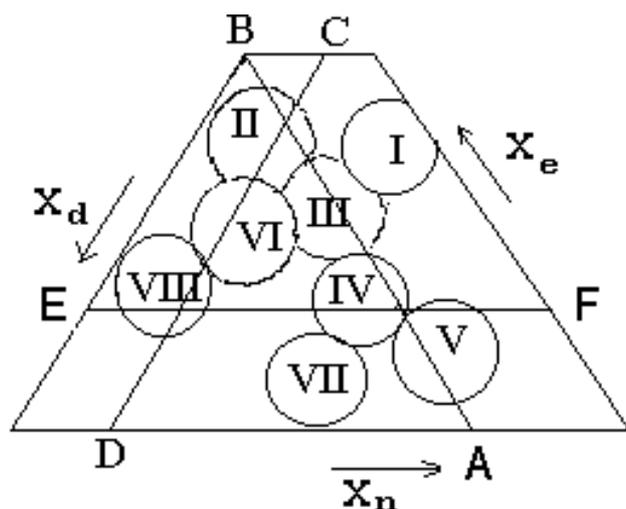


Рис. 14. Классификация растворителей по Снайдеру.

Кругами выделены области, в которых группируются растворители по селективности: X_e – способность к протонодонорным взаимодействиям; X_d – способность к протонакцепторным взаимодействиям; X_n – способность к диполь-дипольным взаимодействиям. АВ, CD и EF- тренды изменения способности к соответствующим взаимодействиям

Этот наглядный подход позволяет предвидеть насколько вероятно изменение селективности при замене одного растворителя другим. Растворители одной группы сходны по селективности, максимального изменения селективности можно ожидать при замене одного растворителя на другой из группы, наиболее удаленной на треугольнике.

Для улучшения разделения высокополярных и ионогенных компонентов и формы хроматографического пика в подвижную фазу вводят специфические добавки: фосфорную и уксусную кислоты при разделении соединений кислотного характера; аммиак и алифатические амины при разделении соединений основного характера, алкилсульфаты натрия при разделении соединений анионного характера, соли тетраалкиламмония при разделении соединений катионного характера.

3.1.1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ)

Обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) имеет ряд преимуществ перед другими вариантами жидкостной хроматографии:

- это очень гибкий метод, так как, изменяя состав водно-органических смесей, используемых в качестве подвижной фазы, можно на одной колонке обеспечить разделение соединений различной природы;

- селективность данного метода почти всегда значительно выше, чем других вариантов хроматографии для всех соединений, кроме сильнополярных

- при использовании гидрофобизированных силикагелей быстро устанавливается равновесие между подвижной и неподвижной фазой, эти сорбенты отличаются высокой эффективностью разделения;

- можно осуществлять разделение соединений, растворимых как в воде, так и в органических растворителях;

- возможность использования в подвижной фазе буферных растворов может улучшить селективность и эффективность разделения ионогенных соединений.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижной фазой служат гидрофобизированные силикагели, которые получают при обработке силикагеля хлор- и алкоксисиланом. Широко в аналитической практике используют гидрофобизированные силикагели с привитыми октадецильными группами (C_{18}) Плотность прививки составляет $1,1- 2,3 \text{ нм}^{-2}$. В зависимости от способа обработки свойства гидрофобизированных силикагелей могут изменяться, поэтому свойства коммерческих колонок различных фирм несколько отличаются. Содержание углерода составляет 5-20%. Степень покрытия поверхности силикагеля органическим модификатором составляет 10-60%, в лучших случаях она достигает 90%. Наличие остаточных силанольных групп приводит к тому, что

адсорбционный и ионообменный механизмы удерживания всегда сопутствуют обращенно-фазовому. Для уменьшения числа силанольных групп сорбенты дополнительно обрабатывают триметилхлорсиланом (это называют эндкеппингом). В табл. 12 представлены типичные обращенно-фазовые сорбенты. Наиболее популярными являются силикагели следующих торговых марок: бондопак, лихросорб, порасил, сепарон, сферисорб, нуклеосил, кромасил. Недостатками обращенно-фазовых сорбентов на основе силикагеля являются ограниченно допустимый диапазон рН и сорбционная активность силанольных групп. Этому недостатка в значительной степени лишены колонки нового поколения фирмы «Феноминекс», ее колонка Луна C₁₈ обладает стабильностью в диапазоне значений рН 1,5-10.

Механизм разделения соединений в этом варианте хроматографии пока до конца неясен. Наиболее удачными и распространенными являются теория, использующая представления о параметрах растворимости Гильдебранта, и сольвофобная теория Хорвата-Меландера. По теории, основанной на параметрах растворимости Гильдебранта, удерживание определяется молекулярными взаимодействиями разделяемых веществ с подвижной и неподвижной фазой. Зависимость фактора емкости вещества от состава подвижной фазы описывается уравнением

$$\ln k = A\varphi^2 + B\varphi + C \quad (12),$$

где φ – объемная доля органического компонента (модификатора) в подвижной фазе, А, В и С – константы.

Однако поведение соединений сложного строения с несколькими функциональными группами часто не удается описать данной зависимостью. Более адекватно закономерности удерживания сорбатов в ОФ ВЭЖХ описываются сольвофобной теорией. Хорвартом и Миландером впервые было показано, что водные элюенты, не содержащие

Таблица 12. Сорбенты для обращенно-фазовой ВЭЖХ

Сорбент	S_p , м ² /г	Диаметр пор, нм	Диаметр частиц, мкм	Форма частиц
Адсорбсил С ₈	450	6	5, 10	Нерегулярная
Адсорбсил С ₁₈	450	6	5, 10	Нерегулярная
Адсорбсфер С ₈	200	8	3, 5, 10	Сферическая
Адсорбсфер С ₁₈	200	8	3, 5, 10	Сферическая
Алтима С ₈		10	5, 10	Сферическая
Алтима С ₁₈		10	5, 10	Сферическая
АльфаБонд С ₈	300	12,5	5, 10	Нерегулярная
АльфаБонд С ₁₈	300	12,5	10	Нерегулярная
М-Бондопак С ₁₈	300	10	10	Нерегулярная
М-Бондопак Фенил	300	10	10	Нерегулярная
Гиперсил С ₈	170	10	3, 5, 10	Сферическая
Гиперсил ОДС	170	10	3, 5, 10	Сферическая
Зорбакс С ₈	350	7	8	Сферическая
Зорбакс ОДС	350	7	8	Сферическая
Диасорб-130-С1	300-350	11	5, 7, 10	Нерегулярная
Диасфер 130-С8	300-350	11	5, 7, 10	Сферическая
Диасфер-130-С18Т	300-350	11	5, 7, 10	Сферическая
Лихросорб RP-2	300	6	10	Нерегулярная
Лихросорб RP 18	300	10	5, 10	Сферическая
Луна С18			3,5	Сферическая
Луна С 8			5	Сферическая
Нуклеосил С ₁₈		10	3, 5, 7, 10	Сферическая
Партисил ОДС-3		5	10	Нерегулярная
Сепарон С ₁₈		10	5,10	Сферическая
Силасорб С ₂		10	5, 7, 10, 15,	Нерегулярная
Силасорб С ₈		10	20	Нерегулярная
Силасорб С ₁₈		10	5, 7, 10, 15, 20	Нерегулярная Сферическая
Сферисорб С ₁₈		10	5, 7, 10, 15, 20	

органических растворителей, могли быть использованы для разделения полярных биологических молекул на октадецилсиликагеле. Даже при отсутствии органического компонента в элюенте, взаимодействие между растворенным веществом и привитыми углеводородными радикалами

неподвижной фазы, являлось причиной удерживания растворенного вещества. Что позволило сделать вывод о том, что удерживание в обращено-фазовом варианте в основном определяется гидрофобными взаимодействиями.

Важнейшую роль в понимании механизма удерживания обращенно-фазовой хроматографии сыграли работы Хорвата и его школы. Суть теории Хорвата заключается в следующем. Существует принципиальное различие между процессами сорбции на полярных поверхностях из относительно неполярных растворителей («нормально-фазовый режим») и сорбции из воды либо сильнополярных растворителей на неполярных поверхностях («обращено-фазовый режим»). В первом случае, между молекулами сорбата и неподвижных фаз образуются ассоциаты за счет кулоновских взаимодействий или водородных связей. Во втором случае, причиной ассоциации на поверхности являются так называемые сольвофобные взаимодействия в подвижной фазе. Для полярных подвижных фаз, в особенности содержащих воду, характерно сильное кулоновское взаимодействие и образование водородных связей между молекулами растворителей. Все молекулы в таких растворителях связаны довольно прочно межмолекулярными силами. Для того чтобы поместить в эту среду молекулу сорбата, необходимо образование «полости» между молекулами растворителя. Энергетические затраты на образование такой «полости» лишь частично покрываются за счет взаимодействия полярных групп в молекуле сорбата с полярными молекулами растворителя. В аналогичном положении по отношению к растворителю находятся и неполярные молекулы неподвижной фазы. С энергетической точки зрения более выгодно такое положение, когда поверхность раздела между полярной средой (растворителем) и неполярными фрагментами неподвижной фазы и молекул сорбата минимальна. Уменьшение этой поверхности и достигается при сорбции (рис. 15).

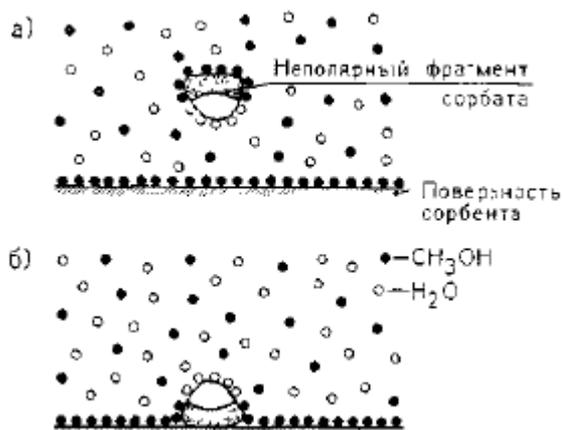


Рис. 15. К механизму обращенно-фазовой хроматографии: а — сорбат в растворе; б — сорбат на поверхности неподвижной фазы. Молекулы воды и органического растворителя обозначены светлыми и темными кружками соответственно.

Обращенно-фазовая хроматография широко применяется не только для разделения нейтральных соединений, но и ионогенных веществ. В принципе, и для таких соединений процесс сорбции описывается сольвофобной теорией. Однако сорбаты такого рода существуют в растворе и адсорбированном состоянии, как в виде нейтральных молекул, так и в виде ионов. Каждой из этих форм соответствует свое значение фактора удерживания. В зависимости от рН среды изменяются соотношение различных форм в растворе и факторы удерживания.

В качестве подвижной фазы обычно используют смеси растворителей, т.к. это позволяет улучшить селективность и эффективность разделения и уменьшить время необходимое для его проведения.

Меняя состав подвижной фазы в ОФЖХ, можно изменять удерживание в очень широких пределах. Почти для всех анализируемых соединений удерживание в некоторых чистых растворителях (метанол, тетрагидрофуран) пренебрежимо мало, а в чистой воде чрезвычайно велико. Поэтому, чтобы добиться приемлемого времени удерживания,

обычно необходимо использовать смеси воды с органическим растворителем – так называемым модификатором. Зависимость фактора удерживания вещества от состава подвижной фазы описывается уравнением

$$\lg k = b + pC \quad (13),$$

где C – концентрация органического компонента (модификатора) в подвижной фазе, b и p – константы.

При постоянных условиях хроматографирования удерживание различных сорбатов определяется следующими факторами:

- гидрофобностью сорбатов;
- дипольным моментом;
- объемом их молекул;
- поляризуемостью;
- уменьшением площади неполярной поверхности при сорбции.

При описании взаимосвязи удерживания и свойств сорбатов наиболее популярны уравнения, связывающие факторы удерживания, измеряемые в хроматографической системе, с коэффициентами распределения (чаще всего в системе октанол – вода). Для соединений близкой структуры наблюдается линейная зависимость между логарифмами коэффициентов распределения и факторами удерживания:

$$\lg k' = a + b \lg P_{i,j} \quad (14),$$

где $P_{i,j}$ — коэффициент распределения вещества между водной и органической фазами.

Во многих случаях логарифм фактора удерживания линейно связан с числом повторяющихся структурных фрагментов:

$$\lg k' = a + bn \quad (15).$$

Самым распространенным дескриптором является число атомов углерода.

Эти соотношения полезны как при подборе состава подвижной фазы как при разделении, так и для идентификации компонентов смеси.

Для решения каждой конкретной задачи состав как подвижной, так и неподвижной фазы должен быть тщательно подобран с точки зрения как физических, так и химических свойств ее компонентов. Общая схема выбора варианта ВЭЖХ в зависимости от природы разделяемых веществ показана на рис. 16.

Система для проведения разделения методом ВЭЖХ состоит из нескольких блоков: насоса, дозатора, колонки, детектора и регистрирующего устройства.

Рассмотрим **основные типы насосов, используемых в ВЭЖХ.**

Шприцевые насосы. Вращение прецизионного синхронного двигателя преобразуется в перемещение поршня в цилиндре. При движении поршня подвижная фаза либо поступает в цилиндр, либо выдавливается из него. Преимущество данного типа насоса – практически полное отсутствие пульсаций потока подвижной фазы, недостаток – невозможность создания градиента с помощью одного насоса.

Пневмоусилительные насосы. Обеспечивают постоянное давление на входе в колонку. Преимущества – отсутствие пульсаций потока, высокая надежность; недостаток – невысокая воспроизводимость объемной подачи подвижной фазы.

Плунжерные возвратно-поступательные насосы. С помощью электромеханического устройства приводится в возвратно-поступательное движение плунжер, перемещающийся в рабочей головке, в результате чего насос либо набирает подвижную фазу, либо подает ее с заданной скоростью. Преимущество – постоянная объемная подача подвижной фазы, недостаток – довольно большие пульсации потока, которые являются основной причиной повышенного шума и снижения чувствительности детектора.

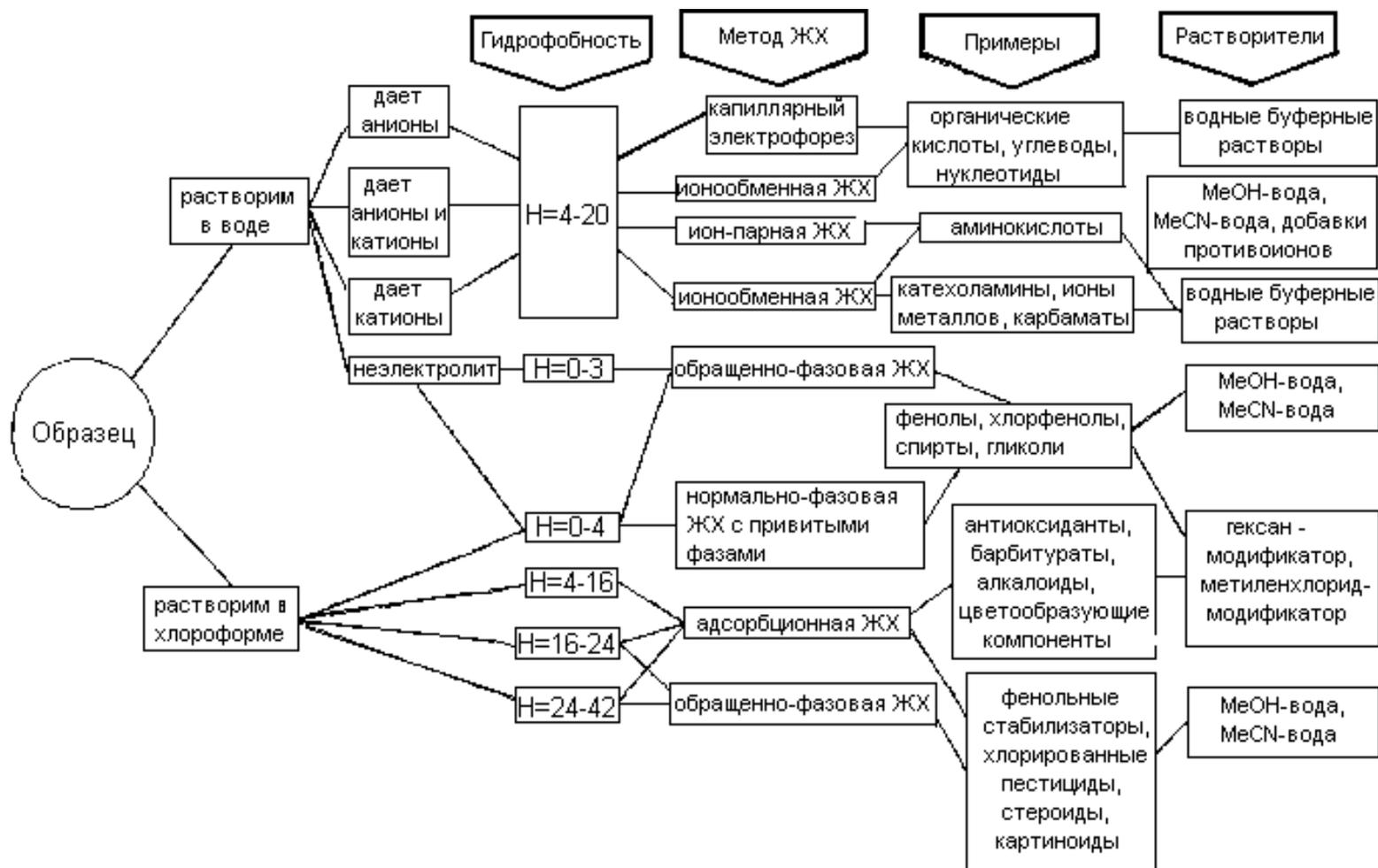


Рис. 16. Выбор условий ВЭЖХ с учетом гидрофобности разделяемых веществ

Для **ввода пробы** в жидкостной хроматографии используют следующие типы дозаторов:

- дозирующая петля
- дозаторы с мембраной (без остановки потока и с остановкой потока).

Основные виды детекторов и их характеристики приведены в табл. 13. Наиболее распространенным детектором в адсорбционной ВЭЖХ является **спектрофотометрический**. В процессе элюирования веществ в специально сконструированной микрокювете измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны, соответствующей максимуму поглощения определяемых веществ. Такие детекторы измеряют поглощение света в ультрафиолетовой или видимой области спектра, причем первый вариант используется чаще. Это связано с тем, что большинство химических соединений имеют достаточно интенсивные полосы поглощения в диапазоне длин волн 200-360 нм. Фотометрические детекторы имеют достаточно высокую чувствительность. Чувствительность УФ-детектора может достигать 0,001 ед. оптической плотности на шкалу при 1% шума. При такой высокой чувствительности может быть зафиксировано до нескольких нг даже слабо поглощающих УФ веществ. Широкая область линейности детектора позволяет анализировать как примеси, так и основные компоненты смеси на одной хроматограмме. Возможности спектрофотометрического детектора существенно расширились после появления его современного аналога – детектора на диодной матрице (ДДМ), работающего как в УФ-, так и видимой области. В таком детекторе «матрица» фотодиодов (их более 200) постоянно регистрирует поглощение электромагнитного излучения в режиме сканирования. Это позволяет снимать при высокой чувствительности неискаженные спектры быстро проходящих через

ячейку детектора компонентов. По сравнению с детектированием на одной длине волны, сравнение спектров, полученных в процессе элюирования пика, позволяет идентифицировать разделяемые компоненты с гораздо большей степенью достоверности.

Принцип действия *флуориметрического детектора* основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного света. Поглощение обычно проводят в УФ-области спектра, длины волн флуоресцентного излучения превышают длины волн поглощенного света. Флуориметрические детекторы обладают очень высокой чувствительностью и селективностью. Наиболее важная область их применения – детектирование ароматических полициклических углеводов.

Амперометрический детектор применяют для определения органических соединений, которые могут быть окислены на поверхности твердого электрода. Аналитическим сигналом является величина тока окисления. В детекторе имеется по крайней мере два электрода – рабочий и электрод сравнения (хлоридсеребряный или стальной), иногда устанавливают вспомогательный электрод, необходимый для подавления влияния омического падения напряжения в растворах низкой проводимости. Успех определения определяет выбор материала и потенциала рабочего электрода. В амперометрическом детекторе используют электроды из углеродных материалов, наиболее часто стеклоуглеродный, и металлические: платиновый, золотой, медный, никелевый. Потенциал рабочего электрода устанавливают в интервале 0 - +1,3 В. Можно проводить измерения либо при постоянном потенциале, либо импульсном режиме, когда задается трехступенчатая развертка потенциала, которая обеспечивает на разных стадиях – окисление вещества, очистку электрода и его регенерацию. Использование этого

детектора особенно важно при определении фенолов, фенольных соединений, гидразинов, биогенных аминов и некоторых аминокислот.

Кондуктометрический детектор используют для определения неорганических анионов и катионов в ионной хроматографии. Принцип его работы основан на измерении электропроводности подвижной фазы в процессе элюирования вещества.

Таблица 13. Детекторы для высокоэффективной жидкостной хроматографии, используемые в анализе объектов окружающей среды

Вид детектора	Измеряемый параметр	Минимально определяемое количество, г	Селективность
Спектрофотометрический	Оптическая плотность	10^{-10}	Высокая
Флуориметрический	Интенсивность флуоресценции	10^{-11}	Очень высокая
Кондуктометрический	Электропроводность	10^{-9}	Низкая
Амперометрический	Величину тока	$10^{-11} - 10^{-9}$	Очень высокая
Масс-спектрометрический	Величину ионного тока	$10^{-12} - 10^{-10}$	Очень высокая

Исключительно информативным является *масс-спектрометрический детектор*, который обладает высокой чувствительностью и селективностью. Основная проблема, затрудняющая использование этого детектора, проблема ввода потока элюента в масс-спектрометр. Развитие микроколоночной хроматографии позволяет

разработать системы прямого ввода потока элюента в ионный источник масс-спектрометра. Используют масс-спектрометры высокого разрешения и достаточного быстродействия с химической ионизацией при атмосферном давлении или ионизацией с применением электрораспыления. Последние модели масс-спектрометров для жидкостной хроматографии работают в диапазоне масс m/z от 20 до 4000 а.е.м. Масс-спектрометрический детектор предъявляет жесткие требования к чистоте растворителей, является дорогостоящим и сложным в обращении.

3.1.2. Использование обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии для решения экологических задач

Определение загрязнений воды и почвы. Высокоэффективная жидкостная хроматография активно используется для определения различных экотоксикантов в водах и почвах. Наиболее значимые задачи, решаемые ВЭЖХ в анализе вод и почвы – определение фенольных соединений, ПАУ и пестицидов. Так как ПДК этих экотоксикантов в водах и почвах очень низки, их определение обычно проводят после предварительного концентрирования или выделения. Для этого можно использовать жидкостную экстракцию, но более удобным и эффективным методом является сорбция или твердофазная экстракция.

Определение фенолов в сточных и природных водах. Весьма распространенными экотоксикантами являются фенол и его хлорпроизводные и нитропроизводные, гваякол, крезолы. Эти соединения образуются в процессе производственной деятельности человека, в частности, в целлюлозно-бумажном производстве. Возникает необходимость их определения в различных типах вод: природных,

водопроводной, производственных и сточных. Состав вод весьма сложен и может включать большое число фенольных соединений, которые образуются как на стадии загрязнения, так и в процессе очистки вод. Наиболее вероятными компонентами сточных вод являются фенол, гваякол, о-, м- и п-крезолы, моно-, ди-, три- и пентахлорфенолы, моно- и динитрофенолы. Для разделения и одновременного определения летучих и малолетучих фенолов весьма удачным является использование высокоэффективной жидкостной хроматографии на гидрофобизированном силикагеле. Эффективность и селективность разделения фенолов определяется составом подвижной фазы. Наиболее часто для разделения фенолов в ВЭЖХ используют смеси ацетонитрила или метанола с буферными растворами (ацетатными или фосфатными), успешное разделение фенолов различного состава может быть достигнуто, если в качестве водного компонента подвижной фазы используется вода, подкисленная уксусной, хлоруксусной или фосфорной кислотой. Время удерживания фенолов определяется их гидрофобностью и увеличивается с ее ростом. Для наиболее значимых фенолов, загрязнителей окружающей среды, удерживание растет в ряду: катехол < фенол < 4-нитрофенол < гваякол < п-крезол < 2,4-нитрофенол < 2-нитрофенол < 2-хлорфенол < 4-хлорфенол < 3-хлорфенол < 2,4-диметилфенол < 4-хлор-3-метилфенол < 2,4-дихлорфенол < 2,4,6- трихлорфенол < пентахлорфенол и зависит от состава подвижной фазы. Чем больше в ней содержание ацетонитрила или метанола, тем меньше удерживание. Для разделения столь сложной смеси фенольных соединений не удастся подобрать подвижной фазы определенного состава. Необходимо либо использование градиентного элюирования, либо разные фенолы делят с использованием различных подвижных фаз.

Низкие ПДК фенольных соединений в водах требуют чувствительных методов детектирования или предварительного

концентрирования. Достаточно успешным является детектирование фенолов с использованием ДДМ, предел обнаружения фенола при длине волны 260 нм в этом случае достигает 1 мг/л. Еще большей чувствительностью и селективностью к фенолу и его производным обладает амперометрический детектор. Его использование позволяет определять фенолы на уровне ПДК даже в природных водах. В природных водах ПДК для фенола составляет 0,001 мг/л, п-хлорфенола – 0,002 мг/л, 2,4-дихлорфенола – 0,004 мг/мл, 2,4,6 – трихлорфенола – 0,006 мг/л и пентахлорфенола – 0,01 мг/л. Амперометрическое детектирование основано на окислении фенолов на поверхности твердого электрода, в качестве которого обычно используют стеклоуглеродный электрод. Установлено, что максимальный сигнал регистрируется при потенциале стеклоуглеродного электрода – +1300 мВ относительно стального или +1100 мВ относительно хлоридсеребряного электродов сравнения. Важным является использование в качестве компонента подвижной фазы фосфорной кислоты, в этом случае минимальны флуктуации базовой линии сигнала амперометрического детектора, что позволяет уменьшить величину минимальной определяемой концентрации, которая соответствует сигналу, равному удвоенной “ширине” базовой линии. В табл. 14. приведены примеры определения фенола в водах в различных условиях, на рис. 17 показана хроматограмма смеси, а на рис. 18 – 20 определение фенолов в водопроводной и сточной воде.

Определение пестицидов. В современном сельском хозяйстве широко применяются химические соединения, используемые для борьбы с вредными организмами, грибами, сорняками, так называемые пестициды. Наряду с несомненной пользой крупномасштабное производство и бесконтрольное применение пестицидов привело к существенному обострению экологической обстановки.

Таблица. 14. Примеры определения фенольных соединений в водах ВЭЖХ

Определяемые фенолы	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Детектор	c_{\min} , мг/л
Катехол, фенол, 4-нитрофенол, 2-нитрофенол, <i>n</i> -крезол, 2,4-динитрофенол, 2,4-диметилфенол, 2-хлорфенол, 4-хлорфенол, 2,4-дихлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол	Spherisorb C ₁₈ , 5 мкм	Метанол (MeOH) – 1% раствор уксусной кислоты градиентный режим: 25 – 100% MeOH	ДДМ	0,03 – 0,1 (прямой ввод) (0,65 – 1,0)•10 ² (предварительное концентрирование)
»	Hypersil Green C ₁₈	Ацетонитрил (АН) - 1% раствор уксусной кислоты; градиентный режим: 30 – 100% АН	УФ	(0,3 – 8,0)•10 ² (предварительное концентрирование)
»	Kromasil C ₁₈ , 5 мкм	MeOH – H ₂ O; градиентный режим: 25 – 100% MeOH	»	(2,5 – 27)•10 ³ (0,04 – 0,3)•10 ³
Фенол, 2-хлорфенол, 2,4-дихлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол		АН – 0,1% раствор H ₃ PO ₄ (57:43)	Амп	0,001 – 0,01
Фенол, гваякол, <i>n</i> -крезол, <i>o</i> -крезол,		АН – 0,1% раствор H ₃ PO ₄ (20:80)	»	0,001 – 0,1
Пирагаллол, 4-гидроксианилин, бензкатехол, 2- гидроксанилин, фенол, крезолы, моно-, ди-, трихлорфенолы, моно-, динитрофенолы, пентахлорфенол	Силикагель C ₁₈ , 3 мкм	MeOH – 0,1 М раствор Na ₂ HPO ₄ – 50 нМ нитрилтрехуксусная кислота – 0,03 М раствор додецилсульфата натрия; градиентный режим	Амп с 4 ячейками	8•10 ⁻⁵ – 4•10 ⁻⁴

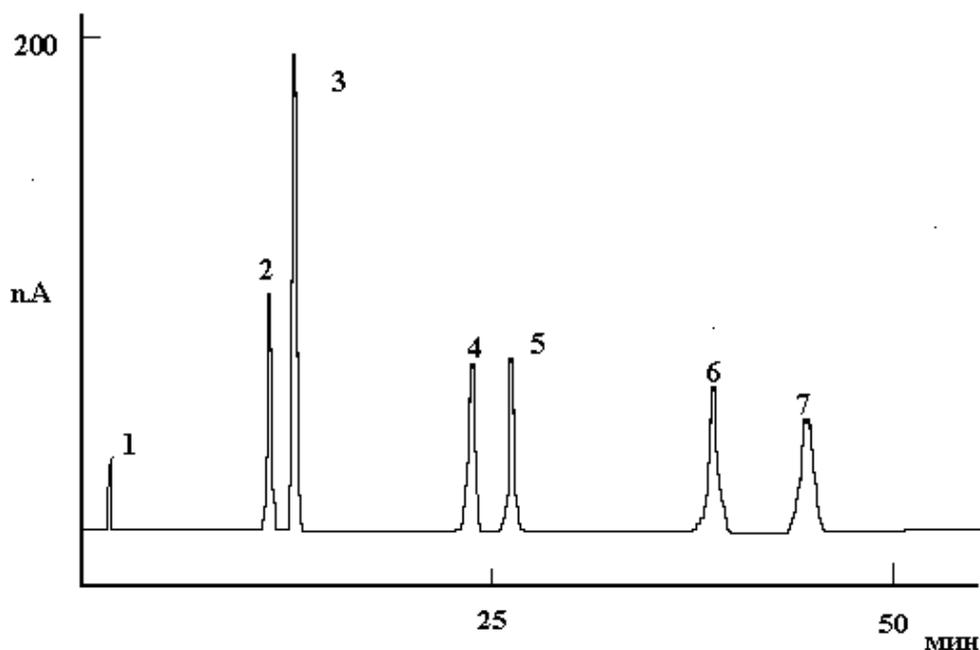


Рис. 17. Хроматограмма смеси: 2 – фенол; 3 – гваякол; 4 – *n*-крезол; 5 – *o*-крезол; 6 – хлоркрезол; 7 – *n*-хлорфенол; 1 – системный пик. Колонка: (150x4,6) мм, Mightysil RP-18; Подвижная фаза: ацетонитрил:вода:фосфорная кислота (20,0:79,9:0,1)%об

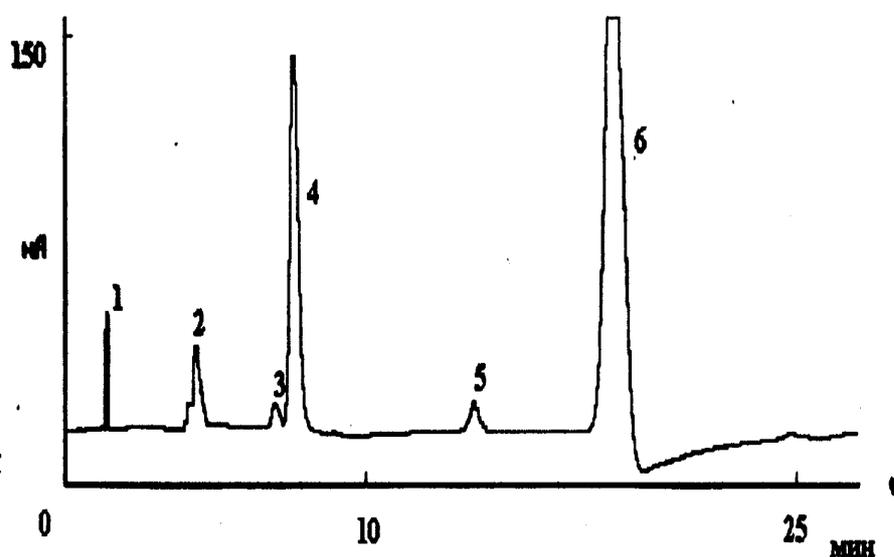


Рис. 18. Хроматограмма образца сточной воды целлюлозно-бумажного комбината: 1 – системный пик; 2 – 2,4,6-трихлорфенол; 5 – пентахлорфенол; 3,4,6 – неидентифицированные пики. Колонка (150x4,6) мм Mightysil RP-18; Подвижная фаза: ацетонитрил:вода:фосфорная кислота (70,0:29,9:0,1) %об. Скорость подачи подвижной фазы 0,7 мл/мин. Детектор амперометрический. Потенциал рабочего электрода 1300 мВ

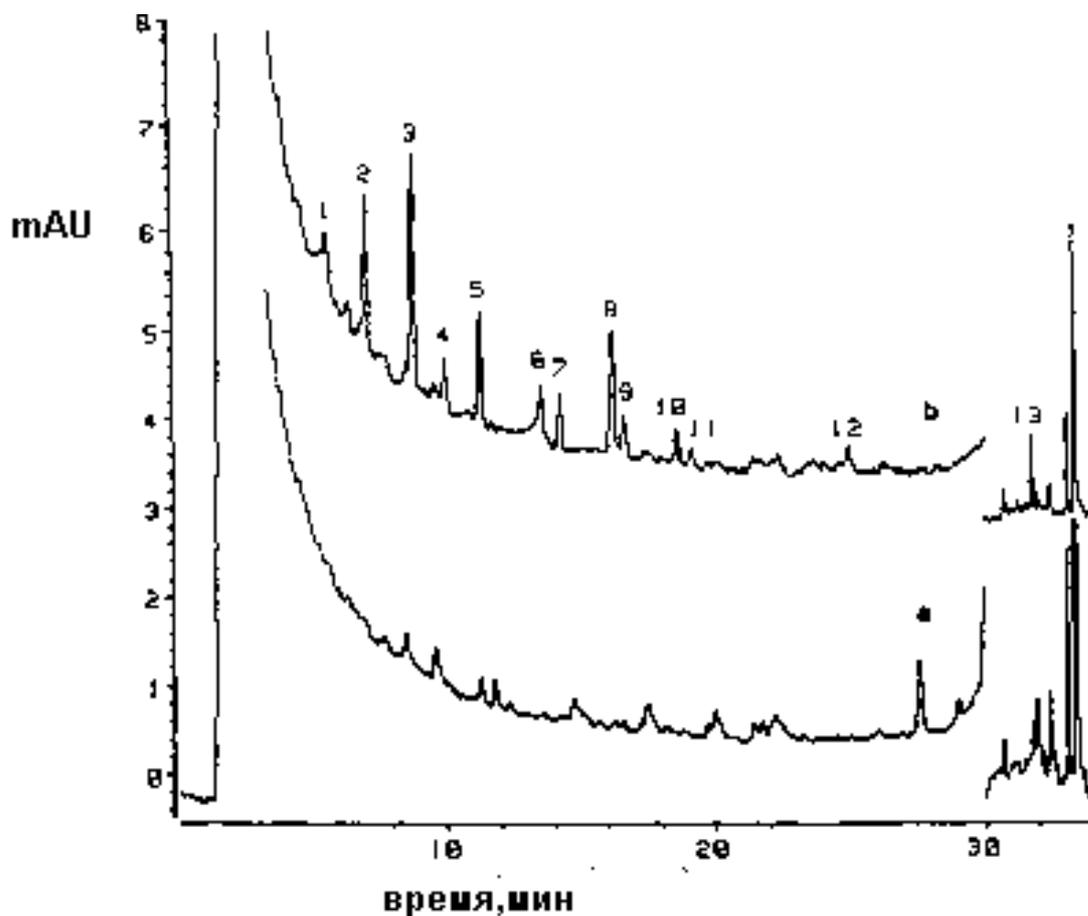


Рис. 19. Хроматограмма водопроводной воды с добавкой фенолов (1 мкг/л) с предварительной ион-парной экстракцией: 1 – фенол; 2 – 4-нитрофенол; 3 – 2,4-динитрофенол; 4 – 2-хлорфенол; 5 – 2-нитрофенол; 6 – 2,6-диметилфенол; 7 – 2,4-диметилфенол; 8 – 2-метил-4,6-динитрофенол; 9 – 4-хлор-3-метилфенол; 10 – 2,4-дихлорфенол; 11- 2,4,6-триметилфенол; 12 – 2,4,6-трихлорфенол; 13 – пентахлорфенол. Колонка: стальная (250x4,6 мм), Spherisorb ODS-2, 5мкм; Подвижная фаза: метанол – 1% уксусная кислота, градиентный режим (метанол 25-100%); детектор спектрофотометрический, 280 нм (пентахлорфенол 302 нм)

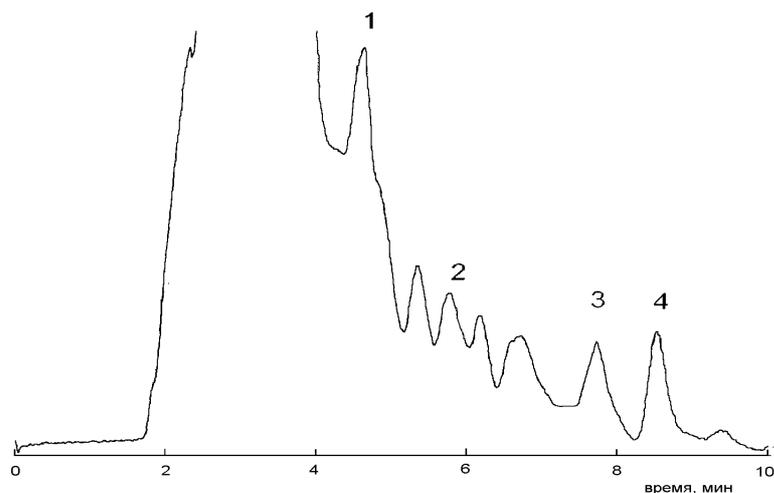


Рис. 20. Хроматограмма образца водопроводной воды с добавками фенолов: 1 – фенол (0,1 мкг/л); 2 – 2-хлорфенол (0,1 мкг/л); 3 – 2,6-дихлорфенол (0,2 мкг/л); 4 – 2,4-дихлорфенол (0,2 мкг/л).

Фенолы концентрировали из 30 мл.

Колонка (150x4,6) мм Mightysil RP-18. Подвижная фаза: ацетонитрил:вода:фосфорная кислота (70,0:29,9:0,1) %об. Скорость подачи подвижной фазы – 0,7 мл/мин. Детектор амперометрический; потенциал рабочего электрода – 1300 мВ

Так как пестициды попадают в организм людей, не имеющих профессионального контакта с ядохимикатами, главным образом, с пищей и водой необходима постоянно действующая система анализа качества сельскохозяйственной продукции, продуктов питания и воды. При этом наибольший интерес представляют методы анализа, которые можно было бы использовать не только в научных исследованиях, но и при широкомасштабном серийном аналитическом контроле. Учитывая высокую токсичность пестицидов, для мониторинга необходимы специфические и очень чувствительные аналитические методы, позволяющие определять остатки пестицидов и их метаболитов на следовом уровне.

Хроматографические методы анализа обладают более высокой чувствительностью и позволяют различать родственные соединения и их метаболиты или продукты гидролиза. В последнее время для определения и разделения пестицидов все чаще используется ВЭЖХ. Метод наиболее удобен при анализе малолетучих или термически нестабильных пестицидов, которые не могут быть проанализированы с помощью газовой хроматографии.

Наиболее успешно ВЭЖХ используется для определения карбаматов, мочевины, гербицидов на основе феноксиуксусных кислот, триазинов и их метаболитов, бензимидазолов и некоторых других соединений.

Одними из наиболее популярных гербицидов являются триазины, большинство из которых являются производными s-триазина – шестичленного гетероцикла с симметрично расположенными атомами азота. Заместители располагаются в положении 2,4 и 6. Наиболее известными являются три триазина: пропазин, атразин и симазин, два последних включены в список приоритетных загрязнителей для стран ЕС. Максимально допустимая концентрация триазинов в питьевой воде установлена на уровне 100 нг/л. При анализе вод триазины обычно предварительно концентрируют, а затем разделяют ОФ ВЭЖХ. Неподвижной фазой служат гидрофобизированные силикагели, подвижной фазой – смеси ацетонитрила с водой или буферными растворами. Детектируют триазины с помощью детектора с диодной матрицей, УФ-, амперометрического и масс-спектрометрического детекторов. Примеры определения триазинов ВЭЖХ в водах и почве приведены в табл. 15.

Таблица 15. Примеры определения пестицидов в водах и почве ВЭЖХ

№	Определяемые пестициды	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Детектор	C_{\min} , мг/л
1.	Триазины: атразин, симазин, пропазин, прометин, тетбутилазин, деэтилатразин, деизопропилатразин, гидроксиатразин	Ultracarb C ₁₈ , 5 мкм	Ацетонитрил (АН) – 1мМ фосфатный буферный раствор, рН 7 градиентный режим 15 – 70 % АН	ДДМ, 220 нм	предварительное концентрирование (0,8-3,0)10 ⁻³ мг/кг
2.	Триазины: гидроксиатразин, гидроксисимазин, гидроксидеэтилатразин	Hypersil C ₁₈	Ацетонитрил(АН) - 1мМ фосфатный буферный раствор, рН 6,5 градиентный режим 30 –100 % АН	амперомет рический МС	2.10 ⁻⁵ М 0,5 мг/кг
3.	Производные фенилмочевины: Монурон, флуметирон, Диурон, сидурон, линурон, небурон	Supelkosil C ₁₈ , 5 мкм	АН– Н ₂ О градиентный режим 40 – 90 % АН	УФ, 220 нм МС	предварительное концентрирование (2-4)10 ⁻³ (0,4-3)10 ⁻⁴
4.	Сульфонилмочевины Хлорсульфурон, метилсульфурон, хлоримурон, тифенсульфурон	Ultraspher C ₁₈ , 5 мкм Viospher C ₆ , 5 мкм	MeOH–H ₂ O(рН 2,5), градиентный режим 40 –70% MeOH	УФ, 224, 234 нм	предварительное концентрирование 0,001
5.	Циносульфурон, тифенсульфурон, метил- сульфурон, сульфометурон, хлорсульфурон	LiChrospher C ₁₈ , 3 мкм	MeOH – 0,1% Н ₃ РO ₄ (45:55)	УФ, 226 нм	0,01-0,05 мг/кг 0,02 мг/кг
6.	Карбаматы: карбарил, профарм, метиокарб, промекарб, хлорпрофам, барбан	Supelkosil C ₁₈ , 5 мкм	АН– Н ₂ О (55:45)	УФ, 220 нм	предварительное концентрирование (0,3-8)10 ⁻³

7.	Соли четвертичных аммониевых оснований: паракват, дикват, дифензокват, хлормекват хлорид, мепикват	Силикагель C ₁₈ , 3 мкм	АН с добавками NaCl, MeOH – раствор гидроксида тетраметиламмония	МС УФ, 230 нм	$(0,1-10)10^{-4}$ $4,4 \cdot 10^{-4}$ мг/кг
8.	Гербициды кислотного характера: дикамба, бентазон, беназолин, 2,4 Д, МЦПА (2-метил-4-хлорфеноксисукусная кислота)	LiChrosorb C ₁₈	MeOH – 0,01 М триэтил амин, pH 6,9 градиентный режим 20-30% MeOH	УФ, 230 нм	предварительное концентрирование $(0,2-1,0)10^{-4}$
9.	Производные фосфоновой и аминокислот: глифосат, глюфосинат, биалофос	Hypersil APS, 5 Nova-Pak C ₁₈ LiChrosorb NH ₂	MeOH – 0,05 М NaH ₂ PO ₄ , pH 5,0 (60:40) АН - 0,05 М NaH ₂ PO ₄ , 0,02 М бромид ТМА	УФ, 240 нм Флуоресц. МС	0,01 $0,2 \cdot 10^{-4}$ $(0,3-1,0)10^{-4}$
10.	Смеси пестицидов различных классов Симазин, фенсульфотион, изопрокарб, фенобукарб, хлортилонил, этридиазол, мепронил, пронамид, мекрпром, бенсулид, изофенофос, тербутол	Капиллярная колонка LC Parkings C ₁₈ , 3 мкм	АН – H ₂ O градиентный режим 45-90% АН	УФ, 220 нм	предварительное концентрирование $(0,15-0,8)10^{-3}$
11.	Симазин, дихлофос, тирам, 1,3-дихлопропен, фенобукарб, пропизамин, ипрофенфос, изопропиолан, хлортилонил, фенитроцион, диазитион, изохатион, тиобенкарб, хлорнитрофен, азулан, ипродион, бенсулин	Ultron VX-ODS, 5 мкм	АН – 1 мМ фосфатный буферный раствор, pH 6, градиентный режим 30-80% АН	УФ, 220, 260, 300 нм	предварительное концентрирование $(0,04-0,5)10^{-3}$
12.	Беномил, 2,4-Д, дикамба, римсульфурон, хлорсульфурон, линурон, хлорсульфоксим, пропиконазол, дифенокназол	Diaspher C ₁₆ , 5 мкм	АН – 0,01 М фосфатный буферный раствор, pH 4,2	УФ, 230	1–10

Еще одной группой пестицидов, для которых использование ВЭЖХ более перспективно, чем капиллярная газовая хроматография, являются производные фенилмочевины. Наиболее известными из них являются линурон, монолинурон, пиразон, и сульфонилмочевины (хлорсульфурон, тифенсульфурон, римсульфурон, метилсульфурон и др.).

ВЭЖХ широко применяется и для разделения и определения карбаматов. Особое внимание обращают на определение карбарила, профарма, метиокарба. Условия разделения фенилмочевин, сульфонилмочевин и карбаматов близки к условиям разделения триазинов.

Круг используемых детекторов включает: детектор с диодной матрицей, УФ-, флуориметрический и масс-спектрометрический детекторы. Достаточно широко используют амперометрический детектор. Этот детектор дает выигрыш в чувствительности по сравнению с УФ при определении производных карбамата и мочевины (алдикарба, карбарила, хлорпрофарма, диметоата, метиокарба) примерно в 10 раз. Некоторые примеры разделения сульфонилмочевин, фенилмочевин и карбаматов показаны в табл. 15 и на рис. 21.

Селективные гербициды – производные феноксисукусной кислоты (2,4-Д, дикамба, бентазон, трихлорпир и др), также предпочтительнее определять ВЭЖХ. Неподвижной фазой служат гидрофобные силикагели, подвижной фазой – смеси ацетонитрила или метанола с буферными растворами или водой с добавкой кислот. Выбор pH подвижной фазы особенно важен при анализе соединений кислотного характера, его значение выбирают ниже, чем pK_a разделяемых соединений. Для повышения селективности разделения можно использовать также ион-парный вариант обращенно-фазовой ВЭЖХ.

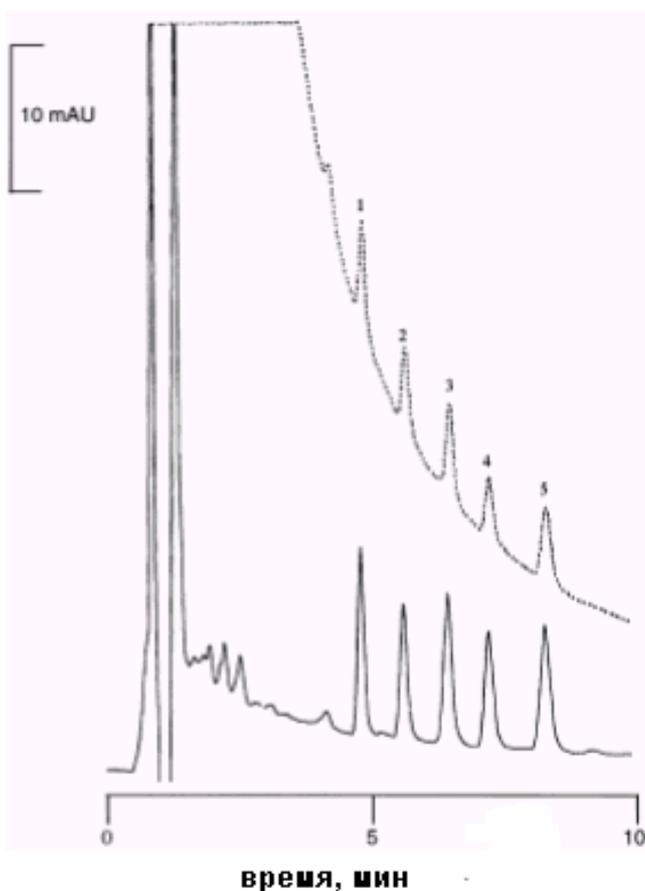


Рис. 21. Хроматограмма экстракта почвы с добавкой (10мкг/г) гербицидов, производных фенилмочевины: 1 – циносульфурон; 2 – тиофенсульфурон метил; 3 – метилсульфурон метил; 4 – сульфометурон метил; 5 – хлорсульфурон.

Колонка стальная (100x4,6 мм), силикагель C_{18} , 3 мкм. Подвижная фаза метанол – 0,1% раствор фосфорной кислоты (45:55). Детектор спектрофотометрический, 226 нм

Триэтиламин используют в качестве ион-парного реагента для увеличения удерживания дикамбы, бентазона, беназолина, 2,4-Д и МЦПА (2-метил-4-хлорфеноксиуксусной кислоты) на октадецилсиликагеле в нейтральной области рН. Таким образом определяют гербициды кислотного характера в питьевых и подземных водах (табл. 15). Детектирование проводят УФ-детектором, наиболее низкие пределы обнаружения получены для УФ-детектора с диодной матрицей.

Важной задачей является также разделения смесей, содержащих пестициды различных классов, так как в объектах окружающей среды они

могут присутствовать одновременно. В зависимости от строения и полярности пестициды в различной степени удерживаются на гидрофобизированных силикагелях: полярные соединения элюируются уже при небольшом содержании ацетонитрила (20-30)% в подвижной фазе, более гидрофобные при большем содержании (до 70%), поэтому для разделения смесей используют градиентный режим элюирования. Примеры разделения смесей пестицидов приведены на рис. 22, 23.

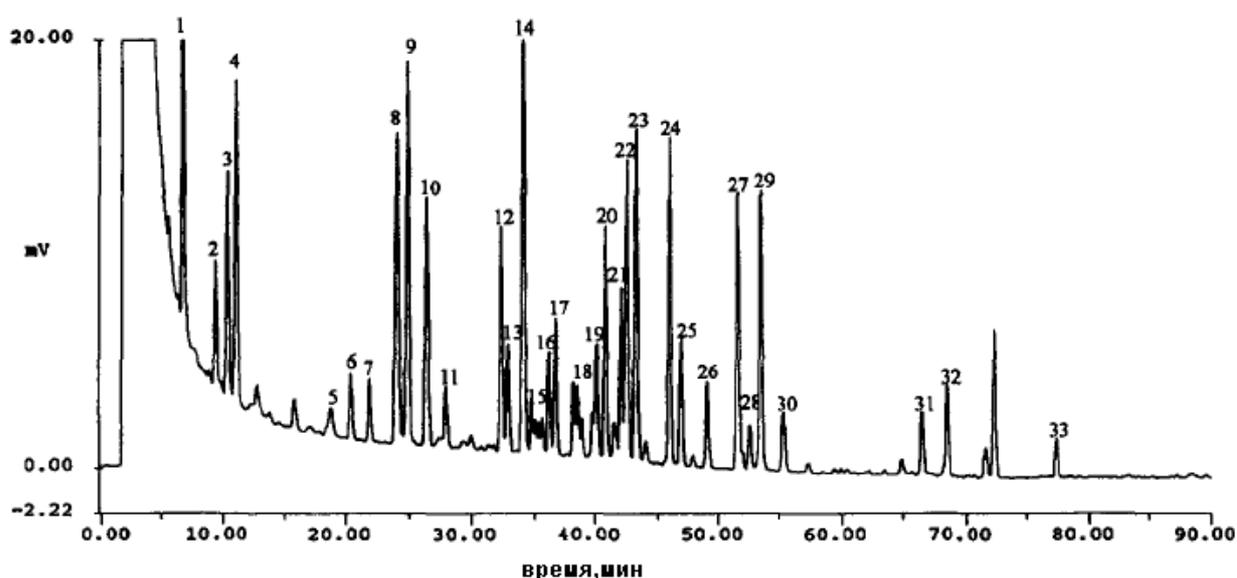


Рис. 22. Хроматограмма воды с добавкой пестицидов (0,2 мг/л) после предварительного сорбционного концентрирования: 1 – дисизопропилатразин; 2 – метамитрон; 3 – хлордиазон; 4 – дисэтилатразин; 5 – кримидин; 6 – карбетамид; 7 – бромацил; 8 – симазин; 9 – цианазин; 10 – дисэтилтербутилазин; 11 – карбутилат; 12 – метабензтиазурон; 13 – хлртолурун; 14 - атразин; 15 – монолинурун; 16 – изопротурон; 17 – метазахлор; 18 – метапротрин; 19 – димефурун; 20 – себутилазин; 21 – пропазин; 22 – тетбутилазин; 23 – линурун; 24 – хлорхурун; 25 – прометрин; 26 – хлорпрофарм; 27 – тербутрин; 28 – метолахлор; 29 – пенцизурун; 30 – бифенокс; 31 – пердиметалин.

Колонка: LiChroCART (250x4 мм), Superspher 100 RP-18, 5 мкм; подвижная фаза ацетонитрил – 1 мМ ацетат аммония (градиентный режим - ацетонитрил 25–90 %). Детектор спектрофотометрический, 220 нм

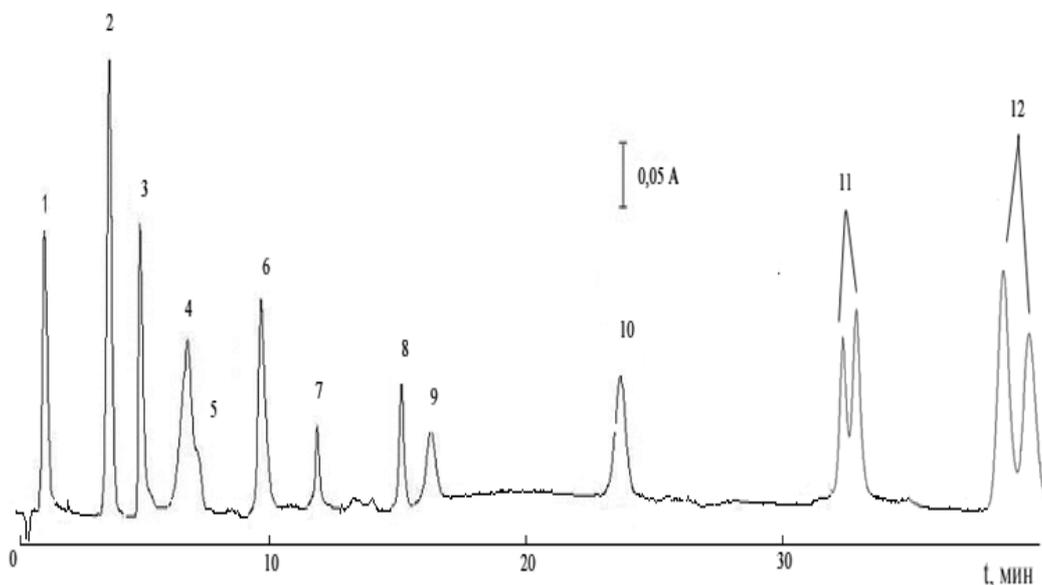


Рис. 23. Хроматограмма разделения смеси пестицидов: 1-метаболит бенонила (2 мкг/мл); 2 – ацетамиприд (4 мкг/мл); 3 – ленацил (10 мкг/мл); 4 – дикамба (4 мкг/мл); 5 – хлорсульфурон (5 мкг/мл); 6 - тирам (5 мкг/мл); 7 – хлорсульфоксим (8 мкг/мл); 8 – пенконазол (5 мкг/мл); 9 – линурон (5 мкг/мл); 10 – флудиоксонил (5 мкг/мл); 11-пропиконазол (5 мкг/мл); 12 – дифеноконазол (5 мкг/мл).

Условия хроматографического определения: колонка Diaspher C16 (150x4,6) мм со средним размером частиц 5 мкм; подвижная фаза ацетонитри-0,01 М фосфатный буферный раствор (рН 4,2) (40:60). Скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Детектор спектрофотометрический (230 нм)

Разделение хлорорганических пестицидов с помощью ВЭЖХ еще только изучается. Отчасти это, по-видимому, объясняется отсутствием общедоступных селективных методов обнаружения после разделения их посредством обращенно-фазовой хроматографии. Предел обнаружения хлорорганических пестицидов (типа ДДТ) и эфиров феноксикарбоновых кислот по поглощению при 254 нм составляет 1-15 и 15 мкг соответственно.

Как метод анализа остатков фосфорорганических пестицидов ВЭЖХ не получила должного распространения. Эти соединения обнаруживают по поглощению при 254 нм, по ингибированию холинэстеразы и

полярнографически. Показана применимость в ВЭЖХ фосфорчувствительных детекторов для селективного обнаружения фосфорорганических соединений.

Одним из важных вопросов, определяющим чувствительность определения пестицидов является способ детектирования. Для большинства исследований характерно использование спектрофотометрического способа, но его использование ограничено рядом факторов: не все соединения хорошо поглощают, разные соединения имеют разные спектры поглощения. Поэтому очень трудно подобрать соответствующую длину волны. В объектах окружающей среды могут быть другие соединения, в присутствии которых определение пестицидов будет затруднено.

В последнее время широко исследуются возможности электрохимического детектирования (ЭХД) в жидкостной хроматографии. Пытаясь повысить чувствительность определения хлорорганических пестицидов с помощью ВЭЖХ, Долан и Зибер сконструировали усовершенствованный вариант электролитического кондуктометрического детектора Коулсона (ЭКДК). Для этого детектора характерна высокая селективность определения хлорорганических соединений, его линейный диапазон соответствует изменению величины концентрации в пределах пяти порядков, а нижний предел обнаружения линдана составляет 5-50 нг. Применимость ЭКДК в аналитической системе была продемонстрирована на примере анализа необработанных экстрактов листьев салата и речной воды, содержащих альдрин и диэльдрин в концентрациях менее $10^{-4}\%$. Использование в данном случае УФ-детектора с длиной волны 254 или 220 нм не позволяет определить альдрин и диэльдрин.

Достижимые с помощью вольтамперометрических детекторов пределы обнаружения, относительная простота устройства и приемлемая стоимость делают этот метод вполне пригодным для анализа следовых количеств органических веществ. При использовании ЭХД, работающего в

режиме восстановления, одной из существенных проблем является восстановление растворенного в элюенте кислорода, пик которого может мешать определению анализируемого вещества. Есть различные пути удаления растворенного кислорода, однако при столь низких определяемых концентрациях пестицидов не всегда удается избавиться от его следовых количеств. В связи с этим, если имеется возможность, определение пестицидов проводится в анодной области потенциалов.

В сочетании с методом ВЭЖХ наиболее часто применяется амперометрическое детектирование, при котором потенциал рабочего электрода поддерживается постоянным и возникающий при окислении или восстановлении электроактивных молекул ток измеряется как функция времени. Амперометрический детектор позволяет определять с высокой чувствительностью широкий круг пестицидов: тирам, триазины (симазин, атразин, цианазин, пропазин и анилазин), карбаматные пестициды (барбан, байгон, беномил, хлорпрофам, ландрин, мезурол, профам, севин, аминокарб, карбендазим, десмедифам), фенилмочевинные пестициды (метобромурона и линурона). Эти соединения с помощью амперометрического детектора определяют в водах, в большинстве случаев пределы обнаружения ниже, чем со спектрофотометрическим детектором. Например, предел обнаружения для аминокарба и карбендазима меньше 1 мкг/л, десмедифама и дихлорана меньше 5 мкг/л, метамитрона 10 нг/л, хлортолуруна и изопротурона 20 нг/л.

Определение полициклических ароматических углеводов (ПАУ). Весьма часто для определения ПАУ в водах и почвах используют жидкостную хроматографию. При необходимости одновременного определения средне и малолетучих ароматических углеводов обычно выбирают обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию.

Вследствие уникальных свойств и широкой доступности октадецилсиликагелевых (ОДС) обращенных фаз большинство исследований ПАУ выполнено на этих фазах. С уменьшением длины цепи, привитого углеводородного радикала, значения коэффициента емкости быстро снижаются, что существенно усложняет анализ многокомпонентных смесей ПАУ. Так, в идентичных условиях (состав подвижной фазы, расход элюента, температура, размеры колонки) время удерживания ПАУ на колонке с Нуклеосилом C_{18} примерно вдвое больше, чем на Нуклеосиле C_8 . Считают, что молекулы ПАУ удерживаются на неполярной поверхности алкилсиликагеля за счет ван-дер-ваальсовых сил, причем прочность связи растет с увеличением длины боковой цепи.

Сорбенты с привитыми полярными группами также используются для разделения ПАУ. Радикалы алкил(арил)алканов, используемых для модификации поверхности сорбентов, содержат одну или несколько полярных групп ($-NH_2$, $-NO_2$, $-OH$, $-CN$ и др.). Механизм удерживания ПАУ на сорбентах с привитыми полярными группами довольно сложен. Учитывается взаимодействие между π – электронной системой компонентов пробы и различными структурами полярной поверхности. Незамещенные ПАУ элюируются в порядке возрастания молекулярной массы. На полярной фазе, содержащей аминогруппы, удерживание ПАУ растет с увеличением количества ароматических ядер в молекуле. В отличие от колонок с гидрофобными силикагелями, на полярных фазах присутствие алкильных групп в молекулах ПАУ незначительно влияет на порядок удерживания, что позволяет использовать указанные фазы для предварительного фракционирования при анализе сложных смесей ПАУ.

На практике чаще разделение ПАУ проводят на гидрофобных силикагелях, поскольку выше селективность разделения, лучше воспроизводимость результатов, а также наблюдается более длительный срок службы хроматографических колонок.

В варианте обращенно-фазовой хроматографии для разделения ПАУ чаще всего в качестве элюентов используют водно-спиртовые смеси (вода-метанол) и водно-ацетонитрильные смеси. Относительные времена удерживания для индивидуальных ПАУ сильно отличаются, поэтому чаще используют градиентный режим элюирования.

Существует множество вариантов детектирования ПАУ: амперометрическое, флуоресцентное, ультрафиолетовое. Наиболее часто используется флуоресцентное детектирование ПАУ. ВЭЖХ в сочетании с флуоресцентным детектором является селективным и чувствительным методом определения ПАУ в природных образцах. Спектрофотометрический детектор в УФ и видимой области на диодной матрице полезен для количественного и качественного анализа ПАУ в почвенных образцах в нанограммном диапазоне, в то время как флуоресцентный детектор рекомендован для анализа ПАУ в водных образцах в пикограммной области.

Наивысшая чувствительность флуоресцентного детектора может быть получена только при оптимальных длинах волн возбуждения и флуоресценции индивидуальных ПАУ. Это возможно только при программировании этих длин волн во времени. После оптимизации всех индивидуальных параметров минимальный предел детектирования отдельных ПАУ в питьевой воде достигает уровня 0,5 пикограмм.

Широко распространенные методики ЕРА рекомендуют определять нафталин, аценафтилен, аценафтен и флуорен при помощи ультрафиолетового детектора и использовать флуоресцентный детектор для определения всех остальных ПАУ. На рис. 24 показано разделение смеси 16 приоритетных ПАУ.

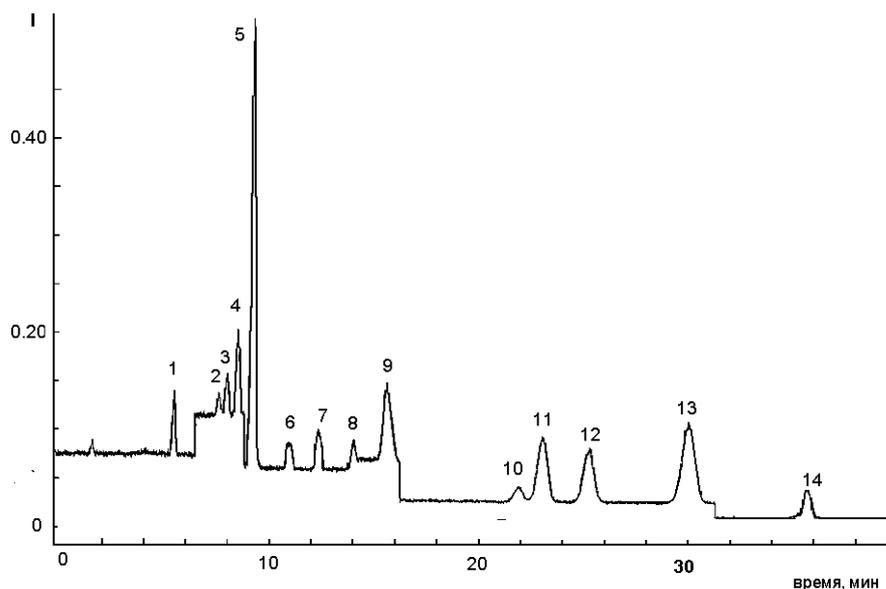


Рис. 24. Хроматограмма стандартной смеси ПА полициклических ароматических углеводородов: 1 – нафталин; 2 – аценафтен; 3 – флуорен; 4 – фенантрен; 5 – антрацен; 6 – флуорантен; 7 – пирен; 8 – 3,4-добенз-антрацен; 9 – хризен; 10 – 3,4-бензфлуорантен; 11 – 11,12-бензфлуорантет; 12 – 3,4-бензпирен; 13 – 1,2,5,6-добензантраце и 1,12-бензперилен; 14 – 2,3-*o*-фениленпирен.

Колонка (150x4,6мм) Mightysil RP-18; подвижная фаза: (75:25) ацетонитрил-вода; детектор – флуоресцентный, режим программирования по длинам волн флуоресценции

Определение ПАУ в объектах окружающей среды, особенно в водах и почвах, является важной проблемой практической аналитической химии.

В литературе много работ, посвященных определению ПАУ методом ВЭЖХ в водах и почвах. Данные этих работ обобщены соответственно в табл. 16 и 17.

Трудности при проведении определения ПАУ ВЭЖХ связаны с необходимостью предварительной очистки экстрактов и принципиальными сложностями идентификации родственных по химической структуре изомерных соединений.

Таблица 16. Определение ПАУ методом ВЭЖХ в водах

Тип воды	Определяемые ПАУ	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Детектор	C _{min} , нг/л
Питьевая	Фл, Б(б)Ф, Б(к)Ф, Б(а)П, Б(г, h, i)П, Инд(1,2,3-сd)П	С-18 (250×4,6) мм, 5 мкм	Ацетонитрил: вода Градиентный режим	Фл	0,05
Загрязненная речная	16 ПАУ	Rad-Pak С-18 (100×8) мм, 5 мкм	Ацетонитрил: вода Градиентный режим	Фл УФ-В	0,05– 9 0,5 –120
Речная	16 ПАУ	Lichrospher PAH С-18 (125×2) мм, 4 мкм	Ацетонитрил: вода Градиентный режим	Фл УФ-В	0,1–2 100
Поверхностные	16 ПАУ	С-18 (250×4,6) мм, 5 мкм	Метанол: вода (85 : 15) с 2 г/л ТСАА	Амп	1–10
Речная и морская	15 ПАУ	Spherisorb S5 PAH (150×4,6) мм, 5 мкм	Ацетонитрил: вода(80 :20) изократи-ческий режим	Фл	0,09–1
Речная	Фл, Б(б)Ф, Б(к)Ф, Б(а)П, Б(г, h, i)П, Инд(1,2,3-сd)П	Erbasil С18 (165×4,6) мм, 5 мкм	Метанол: вода (85 : 15) изократи-ческий режим	Фл	~ 0,1
Поверхностные	16 ПАУ	С-18 (250×4,6) мм, 5 мкм	Ацетонитрил: вода Градиентный режим	Фл	2 (Б(а)П)
Речная	Фл, П, Б(а)П	Supelco С-18 (150×4) мм, 5 мкм)	Ацетонитрил: вода Градиентный режим	Фл	1,0 (Б(а)П)
Природная	16 ПАУ	Lichrospher 100 RP-18 (125×4) мм, 5 мкм	Ацетонитрил: вода (80 :20) изократи-ческий режим	Фл	0,5 нг/л (Б(а)П)
Речная а	Фл, Б(б)Ф, Б(к)Ф, Б(а)П, Б(г, h, i)П, Инд(1,2,3-сd)П	Spherisorb ODS – 2 (300×4) мм, 5 мкм	Ацетонитрил: вода (80 :20) изократи-ческий режим	Фл	~ 8 пг (Б(а)П)
Городские сточные	16 ПАУ	Hypersil Green PAH (100×4,6) мм, 5 мкм)	Ацетонитрил: вода Градиентный режим	Фл	0,6 нг/л

Примечания :Фл – флуоресцентный детектор; Амп – амперометрический детектор;

ТСАА – трихлоруксусная кислота; i-PrOH – изопропанол; 16 ПАУ – 16 ПАУ из стандартной смеси ЕРА

Фл – флуорантен; П – пирен; Б(б)Ф – бенз(б)флуорантен; Б(к)Ф – бенз(к)флуорантен; Б(г, h, i) – бенз(г, h, i)перилен;

Инд(1,2,3-сd)П – индено(1,2,3-сd)пирен;

ПО – предел обнаружения

Таблица 17. Определение ПАУ методом ВЭЖХ в почвах

Тип почвы	Определяемые ПАУ	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Детектор	C _{min} , мкг/л
Осадочные отложения	16 ПАУ	C18 ((250×4,6) мм, 5 мкм)	Ацетонитрил: вода Градиентный режим	Фл	1-10
Почвенные образцы: глины с песком	Фл, Б(б)Ф, Б(к)Ф, Б(а)П, Б(г, h, i)П, Инд(1,2,3-сd)П	C18 ((250×4,6) мм, 5 мкм)	Ацетонитрил: вода Градиентный режим	УФ-В	10-30
Сильнозагрязненные почвы	16 ПАУ	Tracer–Spherisorb ODS ((243×4) мм, 5 мкм)	Ацетонитрил: вода (80:20) Изократический режим	УФ-В Фл	(1–62) (0,1–9)
Слабозагрязненные почвы	16 ПАУ	C18 ((250×4,6) мм, 5 мкм)	Ацетонитрил: вода Градиентный режим	Фл	1-5
Осадочные отложения	15 ПАУ	C18 ((250×4,6) мм, 5 мкм)	Ацетонитрил: вода Градиентный режим	Фл	0,5-1,5

При анализе образцов речных вод, поскольку они могут содержать примеси флуоресцирующих соединений, при относительных временах удерживания ПАУ предложено использование предварительного разделения фракций ПАУ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и последующий анализ отдельных фракций ПАУ методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуоресцентным детектором.

В почвах и сложных природных смесях ПАУ для определения специфических изомеров ПАУ бывает необходимо использовать нормально-фазовый метод ВЭЖХ. Этот метод обеспечивает отделение и концентрирование изомеров, которые сложно определить в общей

фракции ПАУ из-за низких концентраций или из-за относительно низкой чувствительности и селективности флуоресцентного детектирования. Описан метод разделения природного экстракта морских отложений на аминопропилсиликагеле. Эта предварительная стадия обеспечивает получение фракций, содержащих только изомерные ПАУ и алкилзамещенные изомеры. Фракции изомерных ПАУ анализируют методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с флуоресцентным детектором.

Таким образом, ВЭЖХ с использованием флуоресцентного и ультрафиолетового детекторов позволяет определять ПАУ в различных объектах. Успех анализа определяется, как условиями разделения и детектирования, так и грамотной подготовкой пробы к анализу.

Определение загрязнений воздуха. Для определения загрязнений в воздухе ВЭЖХ используется реже, чем в воде и почве. Этот метод незаменим при определении в воздухе токсичных высокомолекулярных и высококипящих органических соединений: к ним относятся диоксины, пестициды, полихлорифенилы, ПАУ, фенолы, ароматические амины и имины, азарены (азотсодержащие гетероциклические углеводороды) и их метильные производные. Во всех случаях предварительно загрязняющие компоненты улавливают из воздуха в специальных концентрирующих трубках, и после экстракции из фазы адсорбента анализируют полученный раствор ВЭЖХ.

Наиболее важным является определение в воздухе ПАУ (ПДК для атмосферного воздуха составляет 10^{-6} мг/м³, воздуха рабочей зоны – $1,5 \cdot 10^{-4}$ мг/м³), анализ концентрата проводят аналогично тому, как описано для вод и почвы. Много внимания уделяют также определению фенолов и крезолов. Эта задача важна для жилых помещений, так как строительные материалы, покрытия, мебель могут выделять фенолы. Их улавливают при прокачивании воздуха через щелочные растворы или на специальных

фильтрах, с которых потом смывают ацетонитрилом или метанолом. Полученный раствор анализируют методом ОФ ВЭЖХ с УФ- или амперометрическим детектором. В воздухе определяют ароматические амины и гетероциклические имины, а также карбонильные соединения, которые являются распространенными загрязнителями воздуха промышленных регионов. Карбонильные соединения (альдегиды и кетоны) – наиболее важные приоритетные загрязнители городского воздуха (ПДК около 0,02 мг/м³), источником которых являются выхлопные газы автомобилей. Разделение компонентов в экстракте воздуха проводят ОФ ВЭЖХ при элюировании смесями ацетонитрил–вода, детектируют соединения УФ-детектором при длине волны 356 нм после их перевода в производные с 2,4-динитрофенилгидразином. При этом другие загрязнения воздуха не регистрируются, и определение является селективным.

3.2. Ионная хроматография

Ионная хроматография – это высокоэффективная жидкостная хроматография для разделения катионов и анионов на ионообменниках низкой емкости. Широкое распространение ионной хроматографии обусловлено рядом ее достоинств:

- возможность определять большое число неорганических и органических ионов, а также одновременно определять катионы и анионы;
- высокая чувствительность определения (до 1 нг/мл без предварительного концентрирования);
- высокая селективность и экспрессность;
- малый объем анализируемой пробы (не более 2 мл образца);

- широкий диапазон определяемых концентраций (от 1 нг/мл до 10000 мг/л);
- возможность использования различных детекторов и их комбинаций, что позволяет обеспечить селективность и малое время определения;
- возможность полной автоматизации определения;
- во многих случаях полное отсутствие предварительной пробоподготовки.

Вместе с тем, как и любой аналитический метод, ионная хроматография не лишена недостатков, к которым можно отнести:

- сложность синтеза ионообменников, что значительно затрудняет развитие метода;
- более низкую по сравнению с ВЭЖХ эффективность разделения;
- необходимость высокой коррозионной стойкости хроматографической системы, особенно при определении катионов.

Метод основан на эквивалентном обмене ионов раствора на ионы неподвижной твердой фазы. Свойствами ионообменников обладает довольно большое число различных природных и синтетических соединений. Наибольшее практическое применение нашли синтетические органические иониты. Большинство этих ионообменников имеет матрицу из сополимера стирола с дивинилбензолом. Этот сополимер легко образуется и обладает достаточно высокой физической и химической устойчивостью в различных условиях. Полимер может быть использован в качестве ионообменника только после введения в матрицу ионогенных групп. Ионогенная группа состоит из двух ионов. Один из них прочно фиксируется за счет ковалентной связи и называется функциональной группой (фиксированным ионом). Ионы противоположенного заряда связываются с фиксированным ионом за счет электростатического

взаимодействия. Они называются противоионами. Эти ионы могут обмениваться на эквивалентное количество ионов того же заряда из раствора. В зависимости от силы сопряженной кислоты (или основания) фиксированного иона ионообменники делятся на сильнокислотные, среднекислотные и слабокислотные (или основные). Классификация ионообменников дана в табл. 18.

Таблица 18. Классификация ионообменников

Ионообменник	Тип	Фиксированные ионы
Катионообменник	сильнокислотный	- SO_3^-
	среднекислотный	- PO_3^- , - AsO_3^-
	слабокислотный	- COOH
Анионообменник	сильноосновный	- R_3N^+
	среднеосновный	- $\text{R}_3\text{N}^+/\text{R}_2\text{HN}^+$
	слабоосновный	- RH_2N^+

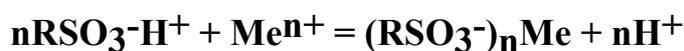
Выбор неподвижной фазы имеет большое значение при проведении любого хроматографического разделения. Синтез сорбентов для ионной хроматографии затруднен, поскольку к ним предъявляется довольно много требований:

- сорбент должен иметь очень низкую ионообменную емкость (0,001-0,1 мэкв/г). Это связано с использованием кондуктометрического детектирования, при котором необходимы элюенты (растворы кислот, солей, оснований) с концентрацией менее 0,01 М. Для эффективного разделения такими разбавленными элюентами требуются низкоемкостные ионообменные сорбенты;

- диаметр сорбента не должен превышать 50 мкм (обычно он равен 5–10 мкм). Только в этом случае можно достичь высокой эффективности разделения;
- зерна сорбента должны обладать высокой механической прочностью и устойчивостью к давлению, которое возникает при работе с мелкодисперсной неподвижной фазой;
- сорбент должен обладать высокой химической устойчивостью по отношению к элюирующему раствору. Он должен сохранять стабильность в широком интервале pH;

Этим требованиям удовлетворяют поверхностно-пористые (пелликулярные) ионообменники, которые состоят из твердого инертного ядра, покрытого тонким слоем ионита. На таких сорбентах быстро устанавливается равновесие, поскольку диффузия в тонкую ионообменную пленку занимает мало времени. В результате ускоряется хроматографический процесс и достигается высокая эффективность разделения. Сорбенты для ионной хроматографии и их основные характеристики приведены в табл. 19.

Разделение катионов происходит на катионообменниках, которые содержат фиксированные группы SO_3^- , PO_3^- , COO^- и катионы в качестве противоиона. Равновесие ионного обмена описывается схемой



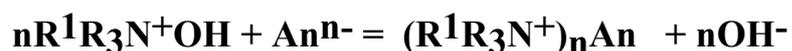
Подвижной фазой при разделении катионов чаще всего являются растворы $((1-5) \cdot 10^{-3} \text{ M})$ соляной, азотной кислот или солей. Разделяемые катионы элюируются с колонки в результате их замещения в фазе ионообменника катионами, содержащимися в подвижной фазе.

Разделение анионов проводится на анионообменниках, которые

Таблица 19. Полимерные ионообменники для ионной хроматографии

Наименование	Диаметр частиц, мкм	Функциональная группа	Ионообменная емкость *, ммольэкв/г	Степень сшивки, %
АльтексОА-1000	12	$-(\text{SO}_3)^-$	—	—
Альтекс Анион НС	12	$-(\text{NH}_3)^+$	3	—
Аминекс А-27	12–15	$-(\text{NH}_3)^+$	3,2	8
Аминекс А-28	7–11	$-(\text{NH}_3)^+$	3,2	8
Аминекс А-27	6–9	$-(\text{NH}_3)^+$	3,2	8
АН-Х	11	—	4	2, 4, 8, 12
Аминекс А-5	11–15	$[\text{N}(\text{CH}_3)_3]^+\text{Cl}$	5	8
Аминекс А-7	7–11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Аминекс А- 8	5–8	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Аминекс А- 9	11–12	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Бекман АА –15	11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Бекман АА – 20	11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Гамильтон НА	7–10	$-(\text{SO}_3)^-$	5	4, 6, 8, 10
Гамильтон НС	7–10	$-(\text{NR}_3)^+\text{Cl}$	5,2	2– 35
Даррум ДС А	14	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Даррум ДС 6А	11	$-(\text{SO}_3)^-$	5	8
Ионекс SB	5–20	$-(\text{SO}_3)^-$	3	7
Ионекс SA	10	$-(\text{NR}_3)^+\text{Cl}$	3	8
Ионопак	10	$-(\text{SO}_3)^-$	3–5	—
Сферон ДЕАЕ	10,16,20	$-(\text{SO}_3)^-$	1,5	—
Сферон микро С300	«	$-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2^+$	2,0	—
Сферон В300	«	$-\text{COOH}$	1,5	—
Хромэкс	11–12	$[\text{N}(\text{CH}_3)_3]^+\text{Cl}$	4	2, 4, 8, 12
Хромэкс катион	11	$-(\text{SO}_3)^-$	4	8, 12

содержат фиксированные группы $-\text{NR}_3$, $-\text{NHR}_2$, $-\text{NH}_2\text{R}$ и анионы как противоионы. Равновесие ионного обмена описывается схемой



Наиболее распространенными элюентами при определении анионов являются $((1-5) \cdot 10^{-3}\text{M})$ растворы карбоната, гидрокарбоната или гидроксида натрия. Разделяемые анионы элюируются с колонки анионами, содержащимися в подвижной фазе.

Время и порядок элюирования катионов и анионов зависит от их заряда и размера гидратированного иона. Ионы удерживаются тем сильнее, чем больше их заряд и меньше размер гидратированного иона. Элюирующая способность подвижной фазы возрастает, с увеличением концентрации ионов, содержащихся в ней, и их сродства к ионообменнику, которое зависит от заряда и размера элюирующего иона. При использовании в элюентах солей слабых кислот их элюирующая способность зависит от pH раствора, поскольку при изменении pH изменяется состав раствора.

В ионной хроматографии наиболее часто используют кондуктометрические детекторы, которые измеряют низкочастотную проводимость элюата. Они просты по конструкции, имеют малый рабочий объем (до 0,5 мкл) и широкий линейный диапазон ГГ, который достигает 10^6 . Детектор состоит из проточной ячейки, в которую подается анализируемый раствор, индикатора и системы регистрации кондуктометрического сигнала. Индикатор градуируется в единицах Ом^{-1} или мкОм^{-1} . Кондуктометрическая ячейка представляет собой камеру малого объема, соединенную с двумя электродами, сделанными из платины, золота, нержавеющей стали или другого инертного проводящего материала. Сопротивление ячейки, как правило, измеряют с помощью моста Уитстона. Электропроводность большинства растворов возрастает примерно на 2% при увеличении температуры на 1°C , поэтому в кондуктометрических детекторах предусмотрена температурная компенсация.

Поскольку в качестве элюентов в ионной хроматографии используют растворы сильных электролитов, для снижения их фоновой электропроводности после разделяющей колонки устанавливают вторую колонку – подавляющую (компенсационную), где элюент преобразуется в воду или раствор, имеющий очень низкую электропроводность, а

разделяемые ионы в сильные электролиты. Такой вариант получил название *двухколоночной ионной хроматографии*.

Подавление фоновой электропроводности элюента можно проводить также с помощью специальных устройств. Наибольшее распространение приобретают системы капиллярного мембранного подавления фоновой электропроводности. Принцип действия таких систем аналогичен подавляющим колонкам с той лишь разницей, что источником иона для подавления является не смола, а раствор данного иона, находящийся во внешнем пространстве устройства. Существуют системы подавления, использующие помимо мембранных механизмов подавления, приложенное к поверхностям мембран электрическое поле. Такие системы называются мембранными электродиализными системами подавления фоновой электропроводности.

Важным достоинством двухколоночного варианта ионной хроматографии являются низкие пределы обнаружения ионов и линейность градуировочного графика в широком интервале их концентраций. Это дает возможность использовать метод стандартов в количественном анализе без обязательного построения градуировочного графика.

При использовании элюентов с низкой электропроводностью кондуктометрический детектор присоединяют непосредственно к разделяющей колонке. Такой вариант ионной хроматографии получил название *одноколоночной ионной хроматографии*.

Для сохранения высокой чувствительности определения, которая в двухколоночном варианте достигается благодаря использованию системы подавления, в одноколоночном варианте используют элюенты с низкой электропроводностью, но в то же время с высоким сродством к анионообменнику, что позволяет достичь быстрого и селективного разделения определяемых анионов.

В качестве элюентов в этом варианте применяют ароматические кислоты или их соли, величина рН элюентов изменяется от 3 до 8. В данном случае можно использовать не только кондуктометрический, но и другие детекторы, например, спектрофотометрический, люминесцентный, полярографический. В этом состоит еще одно преимущество одноколоночного варианта. Однако пределы обнаружения ионов в одноколоночном варианте обычно выше, чем в двухколоночном, а линейность градуировочного графика сохраняется в более узком интервале их концентраций.

Ионная хроматография весьма эффективный метод определения ионов, на рис. 25 и 26 показаны примеры разделения сложных смесей катионов и анионов. Ионная хроматография с кондуктометрическим детектором лучший метод определения неорганических анионов. Разделение проводят на ионообменниках низкой емкости (менее 0,1 мМ/г) чаще всего поверхностно-модифицированных. Нижняя граница определяемых концентраций составляет 1-10 нг/л. Воспроизводимость по высотам и площадям : S_r не более 0,05.

Наиболее часто ионную хроматографию используют для определения:

- анионов неорганических кислот (HCl , HNO_3 , H_2S , H_3BO_3 и др.);
- моно- и дикарбоновых кислоты;
- щелочных и щелочноземельных металлов;
- анионных комплексов переходных металлов;
- оксоанионов;
- алифатических аминов;
- оксидов азота, серы и фосфора.

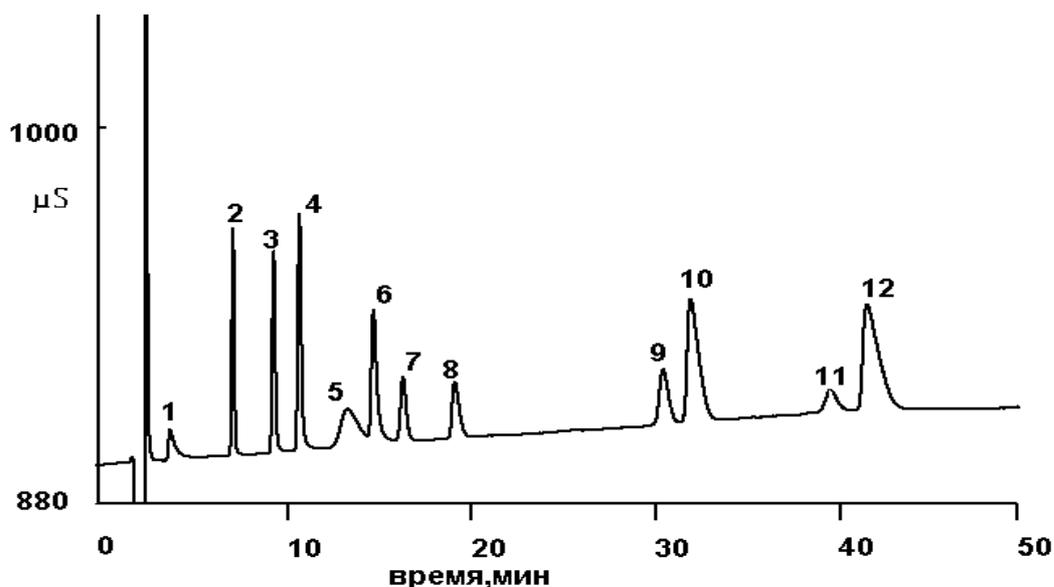


Рис. 25. Разделение смеси катионов на ионообменнике IonPac SCG 1: 1 – медь; 2 – литий; 3 – натрий; 4 – аммоний; 5 – никель; 6 – калий; 7 – цинк; 8 – кобальт; 9 – марганец; 10 – магний; 11 – кальций; 12 – кадмий. Подвижная фаза: смесь 4мМ винной и 2мМ щавелевой кислот

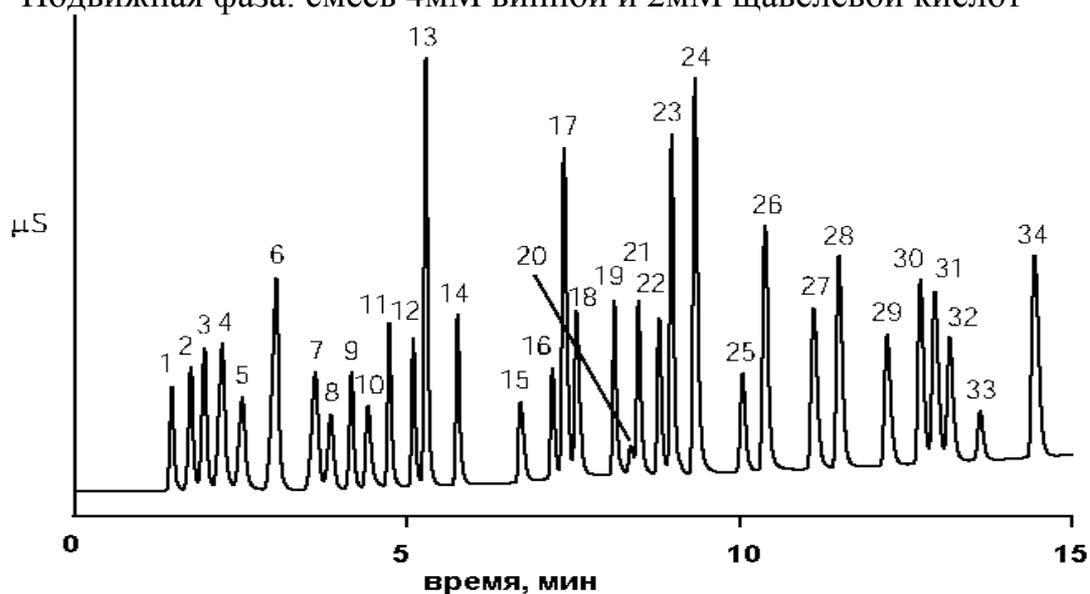


Рис.26. Разделение анионов на ионообменнике IonPac AG11: 1 – изопротилэтилфосфонат, 2 – Quinate; 3 – фторид; 4 – ацетат, 5 – пропионат; 6- формиат; 7 – метилсульфонат; 8 – Pyruvate; 9 – хлорат; 10 – валериановая кислота; 11 – монохлорацетат; 12 – бромат; 13 – хлорид; 14 – нитрит; 15 – трифторацетат; 16 – бромид; 17 – нитрат; 18 – перхлорат; 19 – селенит; 20 – карбонат; 21 – малонат; 22 – малеат; 23 – сульфат; 24 – оксалат; 25 – кетомалонат; 26 – SnO_4^{2-} ; 27 – фталат; 28 – фосфат; 29 – хромат; 30 – цитрат; 31 – трикарбалилат; 32 – изоцитрат; 33 – цис-ацинитат; 34 – транс-ацинитат; Подвижная фаза (50–100) мМ NaOH, градиентный режим

Применение для решения экологических задач. Одно из важнейших направлений использования ионной хроматографии – анализ вод. Известно, насколько важно определять компоненты вод разного типа. Среди этих компонентов существенное место занимают неорганические анионы, ионы металлов, ионогенные органические вещества. Ионная хроматография быстро заняла значительное место в ряду аналитических методов, пригодных для определения указанных компонентов. В табл. 20, 21 и на рис. 27, 28 показаны примеры определения ионов в водах.

Для ионохроматографического определения загрязнений в почвах и донных отложениях после их перевода в водную вытяжку используют те же условия, что и в анализе вод. Интересным примером является определение компонентов сложной смеси анионов в городской почве, хроматограмма водной вытяжки такой почвы показана на рис. 29. В городской почве много хлоридов, что является следствием применения противогололедных смесей. Следует отметить, что ионную хроматографию можно использовать и для определения органических ионов, таких как ацетат, формиат, а также алифатических аминов и гидразинов.

В воздухе с помощью ионной хроматографии определяют высокополярные и реакционные соединения. Это, главным образом, агрессивные неорганические газы, альдегиды, амины. Газы поглощают с помощью индивидуальных ловушек и определяют в виде соответствующих анионов. Например, диоксид серы в виде сульфат-иона, диоксид азота – нитрат-иона, хлористый водород – хлорид-иона. Метод определения формальдегида и ацетальдегида основан на их окислении до формиат- и ацетат-ионов соответственно. Для определения аминов и гидразинов их сорбируют из воздуха на силикагеле и десорбируют водно-метанольным раствором серной кислоты.

Таблица 20. Примеры определения неорганических анионов в водах и атмосферных осадках двухколоночной ионной хроматографией

Объект анализа	Определяемые анионы	Разделяющая колонка	Подвижная фаза	$C_{\text{мин}}$, мг/л	S_T
Речная и сточная воды	NO_3^- , PO_4^{3-}	Dionex Anion (4x250 мм)	1,5 мМ Na_2CO_3 / 5,0 мМ NaHCO_3	0,007 (NO_3^-) 0,017 (PO_4^{3-})	0,018 0,045
Речная, грунтовая и сточная воды	F^- , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , I^- , ClO_4^- , HPO_4^{3-} , SCN^-	ХИКС-1 (3x250 мм)	1мМ тирозин (pH 10,8)	0,01	0,02
Речная, грунтовая и водопродовные воды	SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , AsO_4^{3-} в присутствии F^- , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}	Dionex HPIC-AS (3x250 мм)	1,5 – 2,4 мМ Na_2CO_3 / 2,5 – 3,0 мМ NaHCO_3	0,02 мкг (Se) 0,5 мкг (As)	– –
«	F^- , Cl^- , NO_3^- , SO_3^{2-} , SO_4^{2-}	Dionex Anion (3x250 мм)	3,0 мМ NaHCO_3 / 2,4 мМ Na_2CO_3	0,01	– –
Минеральная вода	F^- , Cl^- , Br^-	«	«	–	–
Геотермальная и озерная вода	F^- , Cl^- , Br^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	«	«	0,005 (F^- , Cl^-) 0,05 (Br^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-})	0,1
Геотермальная вода	F^- , Cl^- , Br^- , SO_4^{2-}	«	2,0 мМ NaHCO_3 / 1,6 мМ Na_2CO_3	высокие	0,001 – 0,021
Атмосферные осадки	F^- , Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}	«	3,0 мМ NaHCO_3 / 2,4 мМ Na_2CO_3	0,02, 0,06 (SO_4^{2-})	0,004 – 0,03
«	F^- , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , Br^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	«	3,0 мМ NaHCO_3 / 3,0 мМ Na_2CO_3	0,001 – 0,005	< 0,05

Таблица 21. Примеры определения неорганических катионов в водах и атмосферных осадках двухколоночной и одноколоночной ионной хроматографией

Объект анализа	Определяемые анионы	Разделяющая колонка	Подвижная фаза	$c_{\text{мин}}$, мг/л	S_T
Речная и грунтовая воды	Mg^{2+} , Ca^{2+}	DionexCation (6x250мм)	1мМ $Pb(NO_3)_2$ – 0,1 мМ HNO_3 (рН 4)	0,05 – 1,1	–
Питьевая и водопроводные воды	Mg^{2+} , Ca^{2+}	NSK GEL IC-Anion-SW (4,6x50мм)	1мМ ЭДТА (рН 6,0)	0,05	–
«	«	Dionex CS-2 (4x250мм)	2 мМ этилендиамин – 2 мМ лимонная кислота	0,01 – 0,02	0,007
«	Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}	Поверхностно-сульфированный катионообменник (емкость 0,017 мэкв/г)	11,5 мМ HNO_3 – 1 мМ этилендиаммоний нитрат (рН 6,1)	0,02	0,025
Дождевая вода	Na^+ , NH_4^+ , K^+	«	6 мМ HNO_3	0,005 – 0,020	0,004-0,02
То же	Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}	«	35мМ HCl , 2 мМ гистидин – 45 мМ HCl	-	–
Геотермальная вода	Li^+ , K^+ , Na^+ , NH_4^+	DionexCation (6x250мм)	3,0 мМ HNO_3	0,005 – 0,015	0,004–0,015

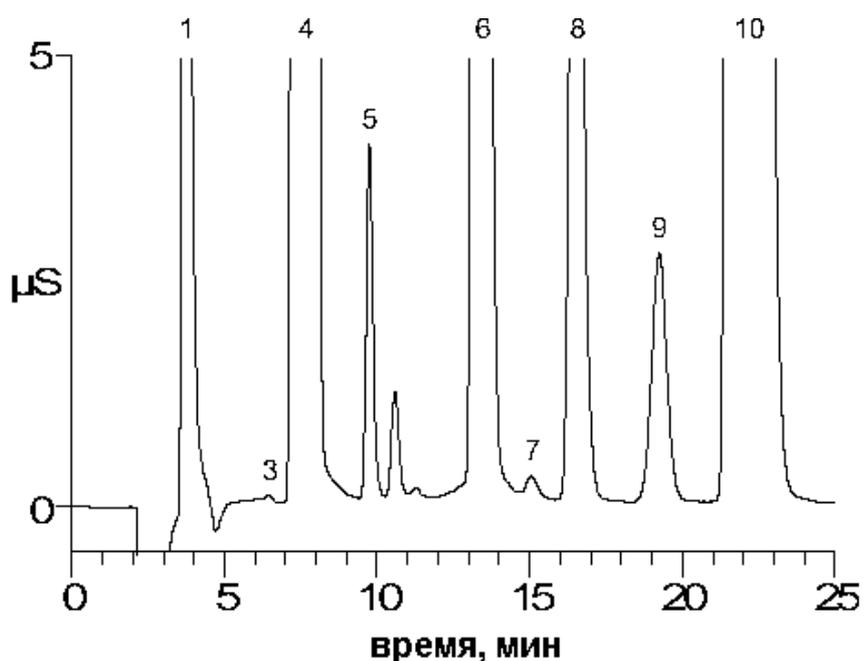


Рис. 27. Разделение анионов (мг/мл) в лечебно-минеральной воде: 1 – фторид (0,8); 3 – бромат (0,01); 4 – хлорид (122); 5 – нитрит (0,5); 6 – бромид (46); 7 – перхлорат (0,07); 8 – нитрат (1,5); 9 – фосфат (1,6); 10 – сульфат (51,0). Подвижная фаза: 9,0 мМ карбонат натрия

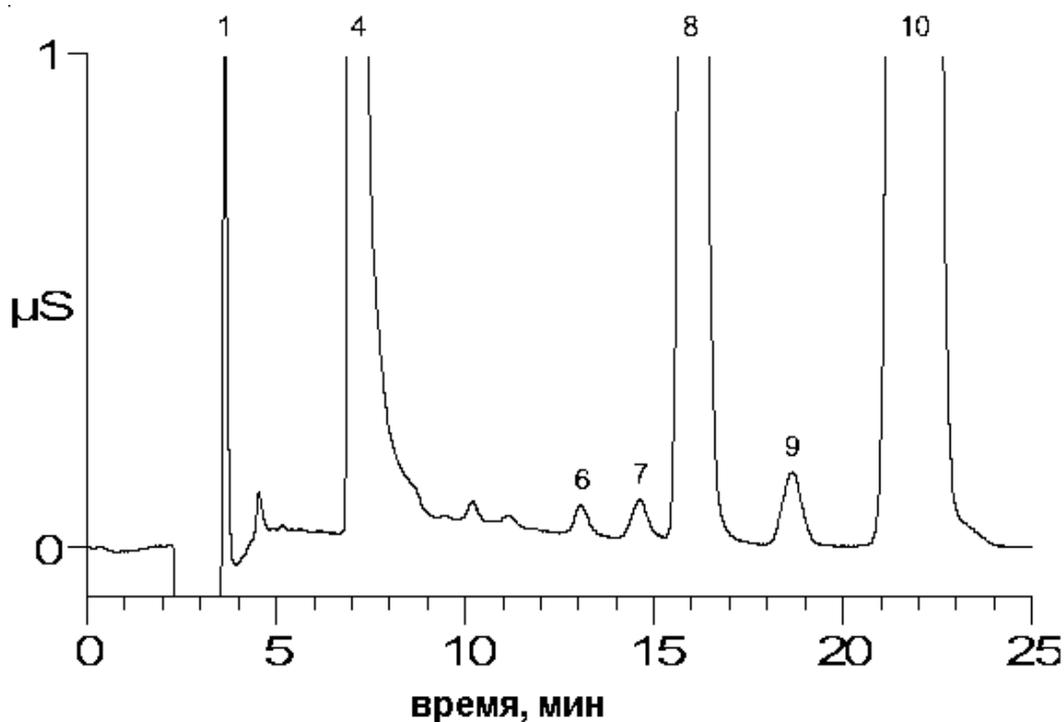


Рис.28. Определение анионов (мг/л) в питьевой воде: 1 – фторид (0,04); 3 – бромат (следы); 4 – хлорид (16,2); 5 – нитрит (не опр.); 6 – бромид (0,03); 7 – перхлорат (0,04); 8 – нитрат (3,9); 9 – фосфат (0,15); 10 – сульфат (18,3). Подвижная фаза: 9,0 мМ карбонат натрия

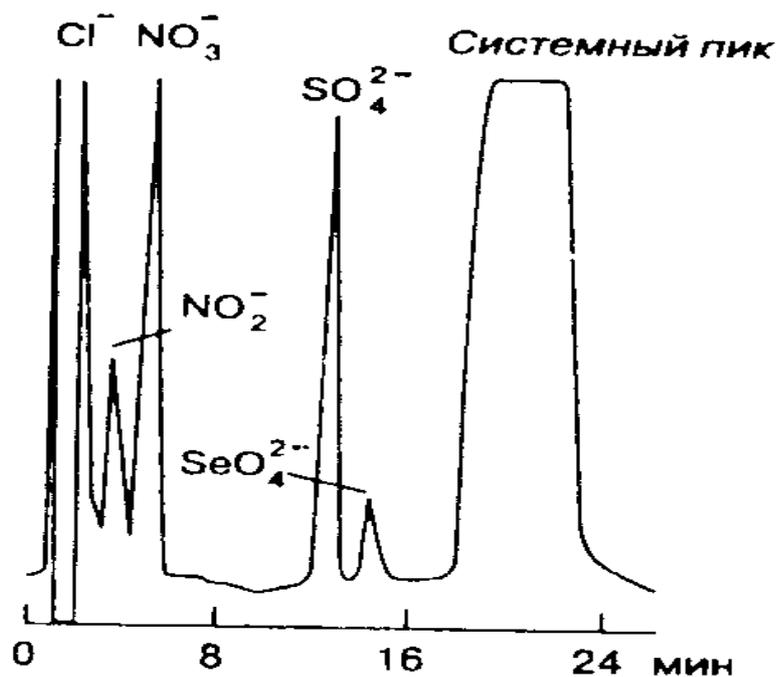


Рис. 29. Хроматограмма водной вытяжки почвы. Колонка стальная (250x4,6) мм, Vydac 302 IC. Подвижная фаза – 4 мМ фталевая кислота, рН 4,6. Детектор – кондуктометрический

Полученный экстракт анализируют, используя сульфокатионообменники и электрохимические детекторы. Высокой чувствительностью к электроактивным соединениям, способным окисляться на стеклоуглеродном электроде, обладает амперометрический детектор. Применение этого детектора позволило повысить чувствительность определения несимметричного диметилгидразина в водах и почвенных вытяжках.

4. Планарная (тонкослойная) хроматография

Тонкослойная (планарная) хроматография занимает одно из ведущих мест в качественном и полуколичественном анализе сложных природных, фармацевтических, медикобиологических и химических объектов. Среди других хроматографических методов планарную хроматографию отличают следующие достоинства и особенности:

- это единственный хроматографический метод, позволяющий проводить полный анализ неизвестной смеси, поскольку исследователь имеет возможность проверить, не остались ли на старте незлюированные компоненты;

- по производительности превосходит газовую и высокоэффективную жидкостную хроматографию, по крайней мере, на порядок; использует более простое и дешевое оборудование;

- обладает высокой селективностью, которую легко варьировать, подбирая состав подвижной фазы; в отличие от ВЭЖХ нет ограничений в выборе растворителей;

- дает возможность одновременного разделения нескольких образцов; использования однократного или многократного элюирования (при различных условиях), а также одновременного разделения компонентов одного и того же образца с помощью различных элюентов;

- возможна оптимизация разрешающей способности хроматографической системы при разделении сложной смеси только для интересующих компонентов, что позволяет экономить время;

- возможно детектирование соединений с высокой чувствительностью и селективностью, которые легко варьировать подбором проявляющего реагента; полученные результаты разделения легко оценить визуально;

– можно сохранять хроматограммы для последующего детектирования и осуществлять спектральную идентификацию хроматографических зон после разделения в любом диапазоне длин волн, включая ИК.

У планарной хроматографии есть и некоторые недостатки:

– ограниченная разделяющая способность из-за сравнительно небольшой длины разделяющей зоны (3-10 см);

– чувствительность ниже, чем в случае ВЭЖХ;

– зависимость результатов анализа от окружающей среды: относительной влажности, температуры, а также наличия загрязняющих веществ в воздухе;

– трудности в работе с образцами, имеющими высокую летучесть, а также с веществами, чувствительными к действию кислорода воздуха или света.

Классическая, наиболее простая и широко используемая методика тонкослойной хроматографии включает проведение следующих основных операций:

- 1) нанесение анализируемой пробы на слой сорбента;
- 2) разделение компонентов пробы на отдельные зоны в потоке подвижной фазы;
- 3) обнаружение зон на слое сорбента (часто реагентом, образующим с разделенными веществами окрашенные соединения);
- 4) количественная оценка полученного разделения, включая определение величины удерживания и определение содержания вещества в зонах на хроматограмме.

Положение зоны вещества на хроматограмме характеризуется величиной R_f , которая равна отношению расстояния от стартовой линии до центра зоны вещества к расстоянию от стартовой линии до линии фронта. Значение R_f – величина постоянная для данного соединения в данной

системе и зависит от ряда условий: способа элюирования, качества и активности сорбента, толщины слоя, качества растворителей, количества нанесенного вещества, длины пробега растворителей, положения стартовой линии и почти не зависит от температуры. По этой величине проводят идентификацию компонентов в смеси.

На качество разделения компонентов смеси в планарной хроматографии влияет большое число факторов: тип разделительной камеры; предварительное насыщение камеры и слоя сорбента парами подвижной фазы; стартовый размер пятна; расстояние от старта до нижнего края пластинки; относительная влажность воздуха лабораторного помещения; средний диаметр частиц и их форма; толщина и равномерность нанесения слоя сорбента; наличие микроповреждений слоя; тип вещества, связывающего сорбент; скорость элюирования; объем растворителя в камере; наличие примесей в элюенте; конвекция в газовой фазе внутри камеры.

Для разделения смесей веществ в тонком слое сорбента применяют адсорбционную, распределительную и ионообменную хроматографию, отличающиеся, прежде всего характером взаимодействий между растворенными веществами и твердой или жидкой фазами, с которыми они соприкасаются. На практике эти взаимодействия почти никогда не протекают изолированно, и разделение веществ обусловлено несколькими взаимодействиями. При выборе подходящего варианта хроматографии в первую очередь следует обратить внимание на строение разделяемых веществ. При помощи адсорбционной и распределительной хроматографии разделяются вещества, строение которых различается природой, числом и характером полярных и неполярных заместителей. При хроматографировании в тонком слое сорбента чаще всего применяют адсорбционную хроматографию, которая проще по выполнению, более эффективна, а результаты анализа более воспроизводимы.

Сорбенты в тонкослойной хроматографии

В качестве сорбентов в ТСХ применяют материалы, которые отвечают следующим требованиям: образуют химически и физически стабильные слои; не образуют ковалентных связей с разделяемыми веществами; не растворяются в подвижной фазе или перемещаются вместе с ней по пластинке; не содержат компонентов, мешающих разделению или детектированию; не имеют собственной окраски; не набухают и не сжимаются под действием подвижной фазы.

В качестве подложки для сорбента используется стекло, алюминиевая фольга, полимерные пленки (полиэтилентерефталат). Для придания стабильности слоя сорбента на подложке используются различные связующие вещества: гипс (5-10%), силиказоль, силикаты щелочных металлов, полиакриламид, полиакриловый эфир, крахмал. К адсорбенту часто добавляют флуоресцентный индикатор для детектирования веществ, поглощающих в УФ-области спектра. С этой целью используют: смесь силикатов цинка и магния; смесь сульфидов цинка и кадмия; вольфраматы щелочноземельных элементов.

Большое значение, особенно для эффективности разделения, имеют такие характеристики сорбентов, как диаметр частиц, среднее распределение частиц по размерам и размер пор. В классической тонкослойной хроматографии для производства пластинок используются частицы с размером 5 – 20 мкм. Для высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) необходим сорбент, диаметр частиц которого составляет 5 – 7 мкм. Сравнение характеристик пластинок для ТСХ и ВЭТСХ приведено в табл.22. Монолитные сорбенты представляют собой новое поколение стационарных фаз, которые могут быть использованы и в планарной хроматографии. Их получают прямой сополимеризацией

Таблица 22. Сравнение характеристик пластинок для классической (ТСХ) и высокоэффективной (ВЭТСХ) тонкослойной хроматографии.

Характеристики	ТСХ	ВЭТСХ
Средний размер частиц, мкм	5 – 20	5 – 7
Толщина слоя, мкм	250	100, 200
Количество проб	12	36 – 72
Длина пробега фронта растворителя, мм	100 – 150	30 – 50
Время разделения, мин	30 – 200	3 – 20
Количество растворителя, мл	50	5 – 10
Предел детектирования, нг		
поглощение	100 – 1000	10 – 100
флуоресценция	1 – 100	0,1 – 10

метакриловых полимеров, например, сополимера глицинметакрилата и этилендиметакрилата. Монолитные стационарные фазы не содержат частиц, а роль разделительного пространства выполняют поверхность и объем проточных каналов (пор). Макропористая структура монолитных сорбентов содержит как минимум два вида пор: макро- и мезопоры. Преимущества таких носителей заключаются в заметном повышении скорости и эффективности разделения, так как для них отсутствуют обычные диффузионные ограничения межфазного массообмена.

Основные типы сорбентов, используемых в ТСХ, описаны ниже.

Силикагель – полярный адсорбент, содержит активные силанольные и силоксановые группы, его применяют для разделения соединений различной полярности.

Оксид алюминия – полярный адсорбент с гетерогенной поверхностью, содержит активные ОН-группы, обладает заметно

выраженными протоноакцепторными свойствами; его применяют для разделения ароматических углеводов, алкалоидов, хлоруглеводородов, стероидов

Флоросил – основной силикат магния, занимает промежуточное положение между оксидом алюминия и силикагелем; удобен для разделения флаваноидов, стероидов и ацетилированных углеводов

Полиамиды – группа полярных сорбентов со смешанным механизмом разделения: карбоксамидная группа ответственна за адсорбционный механизм, метиленовые звенья – за распределительный механизм. Эти сорбенты применяют для разделения пищевых красителей, флаваноидов, танинов, нитрофенолов, спиртов, кислот.

Модифицированные силикагели с привитыми группами (амино, циано, диол-, C₂-, C₈-, C₁₈-), отличными по полярности.

Важной характеристикой сорбента является его активность, она зависит от содержания воды и понижается при увеличении содержания воды в сорбенте.

Для успешного разделения смесей веществ большое значение имеет выбор сорбента. В первую очередь нужно исходить из свойств разделяемых соединений: их растворимости (гидрофильности, гидрофобности), содержания и характера функциональных групп. Насыщенные углеводороды адсорбируются слабо или совсем не адсорбируются на силикагелях и оксиде алюминия. Введение двойных связей, особенно сопряженных, увеличивает адсорбционную способность соединений.

Функциональные группы в еще большей степени усиливают способность веществ к адсорбции. Адсорбционная способность функциональных групп возрастает в следующем порядке: CH=CH < OCH₃ < COOR < C=O < CHO < SH < NH₂ < OH < COOH.

Подвижные фазы в тонкослойной хроматографии

Растворители, применяемые в тонкослойной хроматографии, должны быть чистыми и осушенными. Смеси веществ могут разделяться с помощью одного растворителя, однако обычно применяют системы, состоящие из двух, трех и даже четырех растворителей. Выбор растворителей определяется их элюирующей способностью, которая зависит от полярности растворителя, а также его протонодонорных и протоноакцепторных свойств. Характеристика элюирующей способности наиболее важных для ТСХ растворителей приведена в табл.23. и 24. Для каждой новой пластинки систему растворителей следует готовить заново, так как в ней соотношение компонентов после хроматографирования изменяется.

Таблица 23. Значения силы растворителя для неполярных неподвижных фаз

Группа(по Снайдеру)	Растворитель	S_i
II	Вода	0
	Метанол	2,6
	2-Пропанол	3,9
III	Тетрагидрофуран	4,5
IV	Ацетонитрил	3,2

Существенную роль при разделении веществ с помощью тонкослойной хроматографии играет количество наносимой смеси, оно влияет и на величину R_f и на разрешение пятен. Пробы испытуемых веществ массой от 0,1 до 50 мкг, наносят на пластинку в виде растворов в эфире, хлороформе или другом летучем растворителе.

Таблица 24. Значения силы растворителя S_i для полярных неподвижных фаз

Группа(по Снайдеру)	Растворитель	S_i
I	<i>n</i> -Гексан	0
	<i>n</i> -Бутиловый эфир	2,1
	Изопропиловый эфир	2,4
	Метил- <i>трет</i> -бутиловый эфир	2,7
	Диэтиловый эфир	2,8
II		3,9
	1-Бутанол	3,9
	2-Пропанол	4,0
	1-Пропанол	4,3
	Этанол	5,1
	Метанол	
III		4,0
	Тетрагидрофуран	5,3
	Пиридин	5,5
	Метоксиэтанол	6,4
	Диметилформамид	
IV		6,0
	Ледяная уксусная кислота	9,6
V	Формаид	
		3,1
	Дихлорметан	3,5
VI	1,2-Дихлорэтан	
		4,4
VII	Этилацетат	4,7
	Метилэтилкетон	4,8
	Диоксан	5,1
	Ацетон	5,8
	Ацетонитрил	
VIII		2,4
	Толуол	4,4
	Нитробензол	
VIII		4,1
	Хлороформ	6,0
	Нитрометан	10,2
	Вода	

Природа растворителя может влиять на размер пятна наносимой пробы. При нанесении пробы необходимо, чтобы: растворитель легко удалялся со стартовой зоны, и растворимость анализируемых веществ была бы не менее 0,01 г/мл.

Пробы наносят в виде точки или полоски длиной 5-7 мм при помощи капилляра, пипетки на 0,1 мл или микрошприца, предварительно отметив стартовую линию на расстоянии 1,5 см от края пластинки. Расстояние между отдельными пробами должно быть не менее 1 см. После этого ждут, когда растворитель испарится, затем пластинку опускают в разделительную камеру с выбранной подвижной фазой. В зависимости от того, в каком направлении поступает растворитель на пластинку, различают методы восходящей, нисходящей и горизонтальной хроматографии. На рис. 30 показаны различные методы элюирования в планарной хроматографии. Применение многоступенчатого и двумерного элюирования позволяет повысить селективность разделения за счет

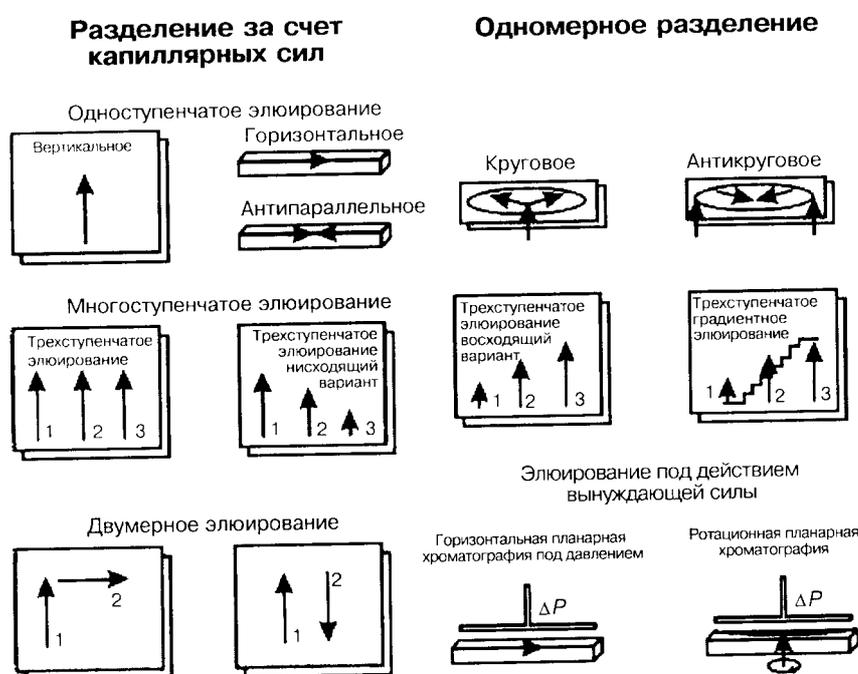


Рис. 30. Варианты элюирования компонентов в тонкослойной (планарной) хроматографии.

изменения элюирующей способности подвижной фазы. Однако во всех указанных способах не удастся исправить существенный недостаток ТСХ – низкую эффективность разделения, поскольку движение элюента осуществляется за счет капиллярных сил. Вариант планарной хроматографии с принудительным движением элюента (под давлением) позволяет существенно улучшить эффективность разделения. Это наглядно подтверждает пример разделения лекарственных веществ на адсорбенте – силикагель 60 при элюировании смесью н-бутанол–хлороформ–метилэтилкетон–уксусная кислота (25 : 17 : 8 : 6), показанный на рис. 31.

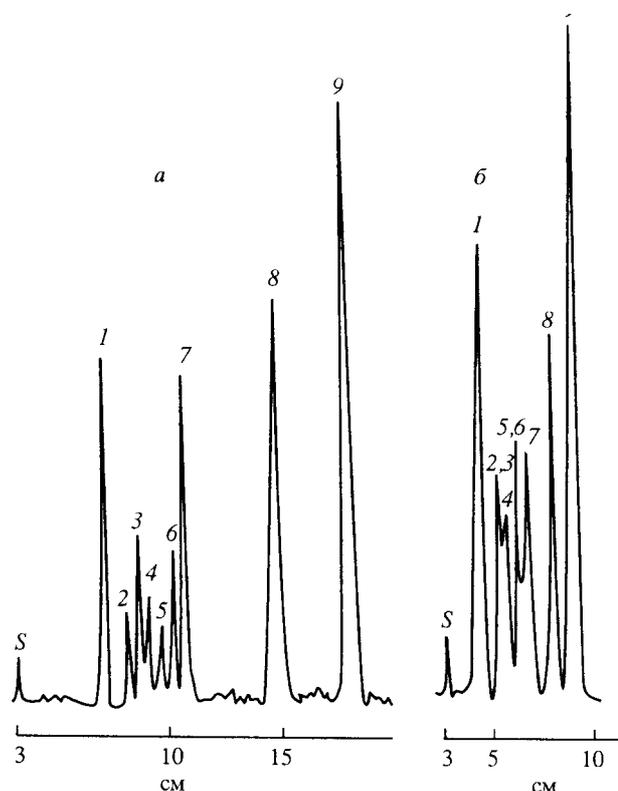


Рис. 31. Хроматограмма смеси: 1 – стрихнин; 2 – эфедрин; 3 – метамфетамин; 4 – фенметразин; 5 – метилфенидат; 6 – амфетамин; 7 – дезопинон; 8 – корамин; 9 – кофеин; S – старт. а – под давлением, б – при использовании обычной тонкослойной хроматографии.

Идентификация компонентов. После разделения веществ необходимо обнаружить их на хроматограмме. Для обнаружения бесцветных веществ, в первую очередь, следует воспользоваться физическими методами, основанными на поглощении света и флуоресценции. Для обнаружения веществ, поглощающих в УФ-области

спектра, часто применяют пластинки со слоем сорбента, содержащим флуоресцирующее вещество или опрыскивают хроматограмму после разделения смеси раствором флуоресцирующего вещества. При облучении пластинки УФ-излучением вещества, поглощающие в этой области спектра, обнаруживаются в виде темных зон (пятен). Флуоресцировать в УФ-свете способно значительное количество веществ, полученные пятна имеют при этом различный оттенок. Для обнаружения флуоресцирующих веществ или веществ, поглощающих в УФ-области спектра, используют источники света с максимумами излучения в области 254 и 365 мкм. Помимо оптических методов обнаружения веществ, применяют химические методы проявления хроматограмм. К химическим методам относится использование «универсальных реагентов» и реагентов, избирательно реагирующих с определенными функциональными группами определяемых соединений.

Для количественной оценки содержания вещества в хроматографических зонах используют различные методы:

1. *Определение с удалением хроматографической зоны с пластинки* можно проводить двояким образом: переносом хроматографической зоны вместе с сорбентом либо экстрагированием хроматографической зоны со слоя сорбента.

2. *Определение соединений непосредственно на пластинке* методом визуального сравнения размеров площадей пятен и их окраски с соответствующими параметрами пятен стандартных образцов

3. *Метод денситометрии*, повышающий точность результатов определения, основан на сканировании хроматограмм в видимом и УФ-свете с помощью «хроматографических спектрофотометров» – денситометров. Денситометры позволяют измерять поглощение света веществом на хроматограмме в режиме пропускания или отражения, а также флуоресценцию и ее тушение. Режим пропускания доступен, если

только исследуемое вещество имеет полосу поглощения в видимой области спектра. В УФ-области регистрацию в режиме пропускания осуществить нельзя из-за собственного поглощения силикагеля и подложки хроматограммы.

4. *Метод видеоденситометрии* – сравнительно новый метод для количественной обработки хроматограмм. Принцип метода заключается во введении изображения хроматограммы в компьютер с помощью видеокамеры или цифровой камеры с последующим сравнением интенсивностей пятен стандартных и определяемых соединений. Видеоденситометр включает осветительный блок, видеокамеру с платой видеоввода или сканер, персональный компьютер с установленной операционной системой Windows и соответствующим программным обеспечением. В России такие комплексы производят НТЦ «Ленхром» (г. С.-Петербург) – денситометр «ДенСкан-04» и «Сорбполимер» (г. Краснодар) – денситометр «Сорбфил». Программа обработки хроматографических данных позволяет выполнять следующие функции: вводить изображения хроматограмм и сохранять их с высоким качеством и разрешением; выделять на введенном изображении хроматограммы рабочий участок, на котором будет производиться дальнейшая обработка изображения; производить автоматический или ручной поиск пятен; проводить обработку пятен, переводить их в форму хроматографических пиков, рассчитывать значения R_f и площади пиков; измерять содержание вещества в анализируемых пятнах (в относительных единицах); вводить значения концентраций для построения градуировочных зависимостей: линейной интерполяцией; линейной аппроксимацией более чем , через две точки; квадратичной интерполяцией; автоматически вычислять содержание вещества в анализируемых пятнах по введенным калибровочным значениям; представлять результаты в виде печатных документов.

Количественную обработку пятна в видеоденситометрии проводят по двум характеристикам: по площади пятна и его «объему» в пространстве, при этом в качестве третьей координаты используют яркость (интенсивность окраски пятна) (рис. 32).

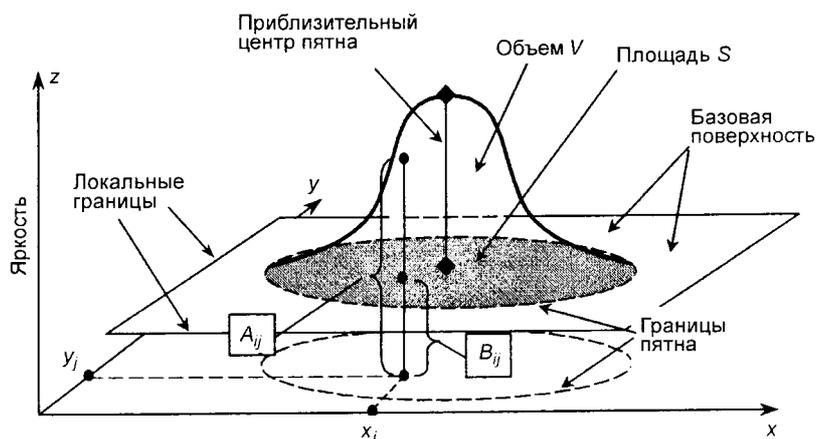


Рис. 32. Вид пространственного распределения яркости в области пятна: $A_{i,j}$ – значение уровня яркости точки пятна; $B_{i,j}$ – значение уровня яркости точки на базовой поверхности.

5. *Денситометрия с планшетным сканером с программным обеспечением для обработки хроматограмм практически не отличающимся от стандартных программ, применяемых для видеоденситометров, но существенно меньшей стоимости. При этом сканирование дает более четкое изображение хроматографических зон, что можно объяснить пониженным влиянием неравномерности освещения анализируемых объектов, чем в случае видеоденситометра (рис. 33).*

Применение для решения практических задач. Применение ТСХ особенно эффективно для предварительного разделения (по классам, группам, видам веществ) компонентов сложных смесей органических загрязнителей воды, почвы и воздуха. Индивидуальная идентификация с помощью одной лишь ТСХ

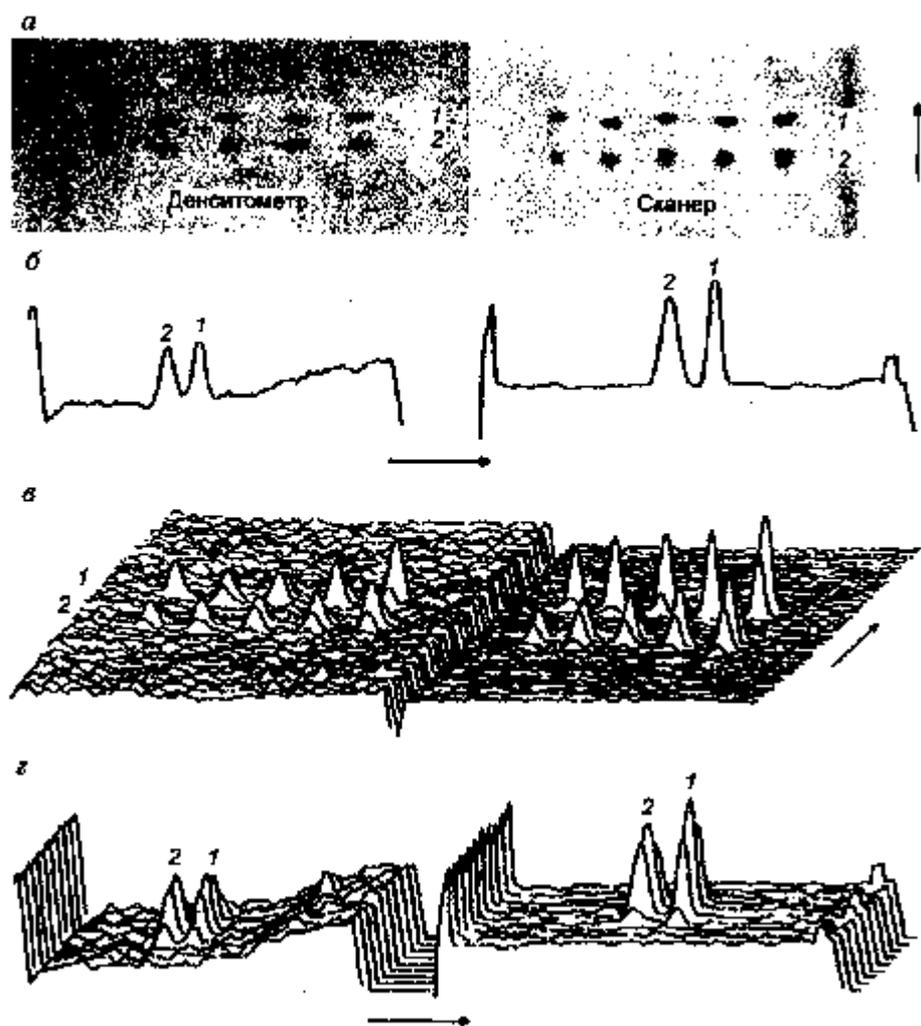


Рис. 33. Хроматограммы, полученные при разделении красителей азорубина (1) и амаранта (2) с применением системы ввода изображения с помощью видеоденситометра «ДенСкан-2» (слева) и планшетного сканера «Mustek Scan Express» (справа): а – полутоновое изображение рабочей области; б – денситограммы; в – 3D-изображение рабочей области; г – 3D-изображение области разделения пиков.

затруднена из-за отсутствия высокочувствительных и селективных детекторов, кроме того, определение целевых компонентов менее точно, чем в случае ГХ и ВЭЖХ. Часто ТСХ применяют на первом этапе анализа для разделения сложных и многокомпонентных смесей органических соединений на отдельные более простые группы, и уж потом проводят более детальное исследование этих групп «более тонкими» методами (ГХ, ВЭЖХ, ЯМР, ИК или масс-спектрометрией).

Использование ТСХ при анализе загрязненной пресной и морской воды открывает широкие возможности для препаративного разделения, предшествующего другим методам, разделения искомых примесей и дополнительной идентификации. ТСХ используют для обнаружения и полуколичественного определения веществ разной природы: поверхностно-активных веществ, углеводов, ПАУ, фенолов, пестицидов.

Для определения неионных ПАВ в сточных и речных водах используют пластинки со слоем силикагеля или Кизельгеля G. На пластинку наносят хлороформенный экстракт ПАВ и разделяют их при использовании в качестве подвижной фазы смесей этилацетат : вода : уксусная кислота. Обнаруживают пятна при опрыскивании смесью: реактив Бургера : фосфорная кислота : этанол : 5% раствор $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10:1:10:5). ПАВ проявляют в виде розовых пятен. Метод позволяет определить в воде от 0,1 до 1,0 мг/л неионогенных ПАВ. Из сточных вод в этих условиях экстрагируются ионные ПАВ, но они движутся вместе с фронтом растворителя и не проявляются.

Предложено много методик определения фенолов. Хлорфенолы разделяют на пластинках с оксидом алюминия при многократном элюировании бензолом или на силикагелевых пластинках при элюировании смесью бензола и петролейного эфира (1:1). Определяют фенолы проявлением 2% раствором 4-аминоантипирина (предел

обнаружения 0,5 мкг/л) или по флуоресценции при 254 нм (до 0,5 мкг фенолов). Второй вариант определения фенолов – разделение в виде: антипириновых, 4-аминоантипириновых производных или с *n*-нитрофенилазокрасителями.

Часто ТСХ определяют в водах пестициды: хлорфеноксиуксусные кислоты, хлорсодержащие пестициды, триазиновые гербициды, гербициды на основе мочевины, карбаматы и фенилмочевины и фосфорорганические пестициды. Примеры и условия определения пестицидов в водах представлены на рис. 34 и в табл.25.

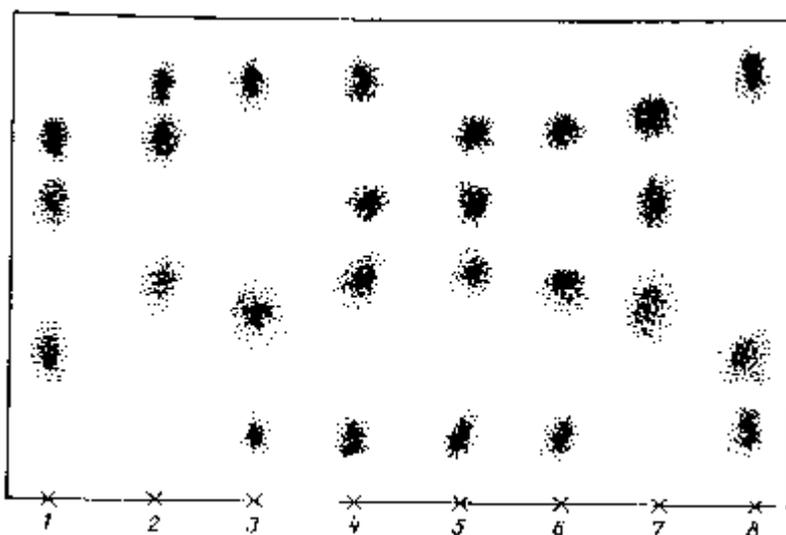


Рис. 34. Хроматограмма разделения гербицидов (зоны сверху вниз): 1 – прометон, атразин, промазин; 2 – симетрин, пропазин, прометрин; 3 – атратон, симазин, прометрин; 4 – атратон, десметрин, атразин, прометрин; 5 – атратон, симетрин, атразин, промазин; 6 – атратон, десметрин, промазин; 7 – симазин, атразин, промазин; 8 – атратон, прометон, прометрин.

ТСХ является недорогим и эффективным методом разделения, идентификации и полуколичественного определения пестицидов в почвах. В качестве примера можно привести метод определения альдрина и гепта-хлора на пластинках с оксидом алюминия; для их элюирования используют смесь изооктана и пиридина (7:3) или изооктана и диэтилового

эффира (7:3). Для обнаружения пестициды опрыскивают реагентом Митчела с последующим облучением УФ-излучением. Еще одним примером служит определение фосфорорганических пестицидов на пластинке со слоем силикагеля G фирмы Merck. В качестве подвижных фаз используют смеси: этилацетат : этанол : раствор аммиака (80:15:5); толуол : уксусная кислота : вода (60:60:6); бензол : этанол (9:1); этанол : этилацетат : уксусная кислота (3:4:2); бензол : хлороформ : этилацетат : пропанол (4:2:4:2). Для обнаружения фосфорорганических пестицидов предложено несколько проявляющих реагентов: раствор 4-(*n*-нитробензил)пиридина для обнаружения инсектицидов; смесь растворов нитрата серебра и бромкрезолового синего в метаноле – для проявления пятен пестицидов, содержащих тиофосфорильные группы. Для обнаружения Р=О-группы используют метод ингибирования фермента холинэстеразы, пестициды обнаруживаются в виде белых пятен на голубом фоне. В реальных образцах почвы могут присутствовать смеси пестицидов различной природы и их состав обычно неизвестен. ТСХ, оснащенный современными денситометрами, помогает решить эту сложную проблему. Денситометр позволяет сканировать полученные хроматограммы одновременно при нескольких длинах волн. Сочетание этой возможности с легкостью и экспрессностью варьирования природы сорбента на пластинке и состава элюента позволяет за короткое время получить большой объем информации и дать предварительную оценку загрязнения образцов почвы. Пример такого определения показан на рис. 35. Полученные результаты можно далее уточнить с использованием ВЭЖХ, ГХ или ГХ-МС.

В органических почвенных вытяжках определяют также ПАУ, разделяя их на силикагеле или целлюлозе, идентификацию проводят флуоресцентным методом.

Таблица 25. Примеры определения пестицидов в водах тонкослойной хроматографией

Разделяемые пестициды	Адсорбенты	Элюенты	Проявитель	С _{мин} , мкг
Хлорсодержащие пестициды: дильдрин, ДДТ линдан, гептахлорэпоксид, альдрид, гептахлор	Силикагель	CCl ₄	Родамин Б	-
12 пестицидов: эндрин, хлордан, гептахлор, нонахлор, изодрин, альдрин, гептахлор- борнен, гептахлорциклопентадиен, и др.	«	CCl ₄ -гексан (2:8)	«	-
Триазиновые гербициды: атранон, атразин, прометон, прометин, пропазин, симазин, симетрин	Силикагель G	Хлороформ-ацетон (9:1)	0,5% Раствор бриллиантового зеленого в ацетоне/Br ₂	-
Гербициды на основе мочевины: линурон, монурон, диурон, небурон, фенурон	Силикагель	Метан- 2,2',4триметилпентан- метилхлороформ (5:60:35)	Нингидрин/бутанол/ уксусная кислота	0,2
Карбаматы и фенилмочевины: ИКФ, хлор- ИКФ, фенурон, линурон, байгон, пиролан, диметолан, метасил, изолан, мезурол	«	Бензол; бензол-ацетон (95:5); циклогексан-этанол (85:15) гексан- ацетон (70:30)	<i>n</i> -Диметил-аминобензаль- дегид (карбаматы); NaNO ₂ /α-нафтол (мочевины)	4-5 2-5
Фосфорсодержащие пестициды: бромофос, дибром, этион, диазинон, мекарбам и другие	Силикагель G	Гексан-ацетон (5:1), хлороформ - ацетон (9:1) и хлороформ – уксусная кислота (9:1) последовательное элюирование	HI/(NH ₄) ₂ MoO ₄ /SnCl ₂ /NH ₃	1 мкг/л
Феноксиуксусные кислоты: 2,4-Д, 2,4,5- трихлорфенокси уксусная, 4-хлор-2-метил- феноксиуксусная, 2,2'-дихлорпропионовая	Кизельгель G Силикагель G	Циклогексан-бензол-гексан- уксусная кислота (14:3:1:2)	AgNO ₃ /2-феноксиэтанол	

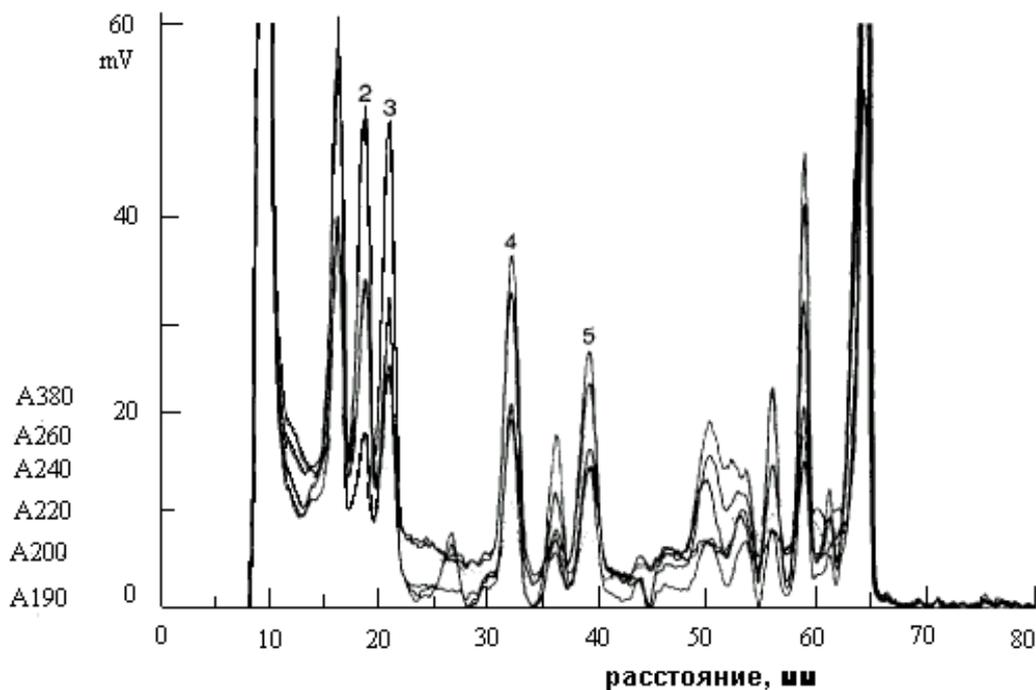


Рис. 35. Денситограмма ТСХ-хроматограммы питьевой воды с добавкой гербицидов (20 нг в пробе): 1 – метоксурон; 2 – монурон; 3 – хлортолурун; 4 – небурон; 5 – линурон при различных длинах волн (200; 220; 240; 260; 280; 300 нм).

Для определения загрязнителей в воздухе его предварительно аспирируют через различные фильтры, уловленные вещества экстрагируют подходящим растворителем, и полученный экстракт анализируют ТСХ. ТСХ позволяет определять в воздухе ароматические углеводороды, ароматические карбонильные соединения, ароматические амины и имины, фенолы, металлорганические соединения, сложные эфиры фталевой кислоты. Сканирование хроматограмм с использованием спектроскопических методов, особенно флуоресценции, позволяет идентифицировать весь спектр токсичных соединений.

Наиболее часто определяют ПАУ и азарены; в качестве адсорбентов используют: целлюлозу, силикагель, оксид алюминия, флоросил. Элюируют ПАУ и азарены смесями гексана с бензолом, пентана с хлороформом, бензола с хлороформом. В России разработана стандартная методика определения бенз(а)пирена в воздухе рабочей зоны предприятий,

основанная на измерении люминесценции этого канцерогенного соединения, а также других ПАУ при температуре жидкого азота на пластинке с оксидом алюминия. Предел обнаружения ПАУ составляет 0,5 мкг/л. На рис. 36 показаны хроматограммы смеси азаренов и полициклических карбонильных соединений, которые входят в перечень токсичных загрязнителей городского воздуха.

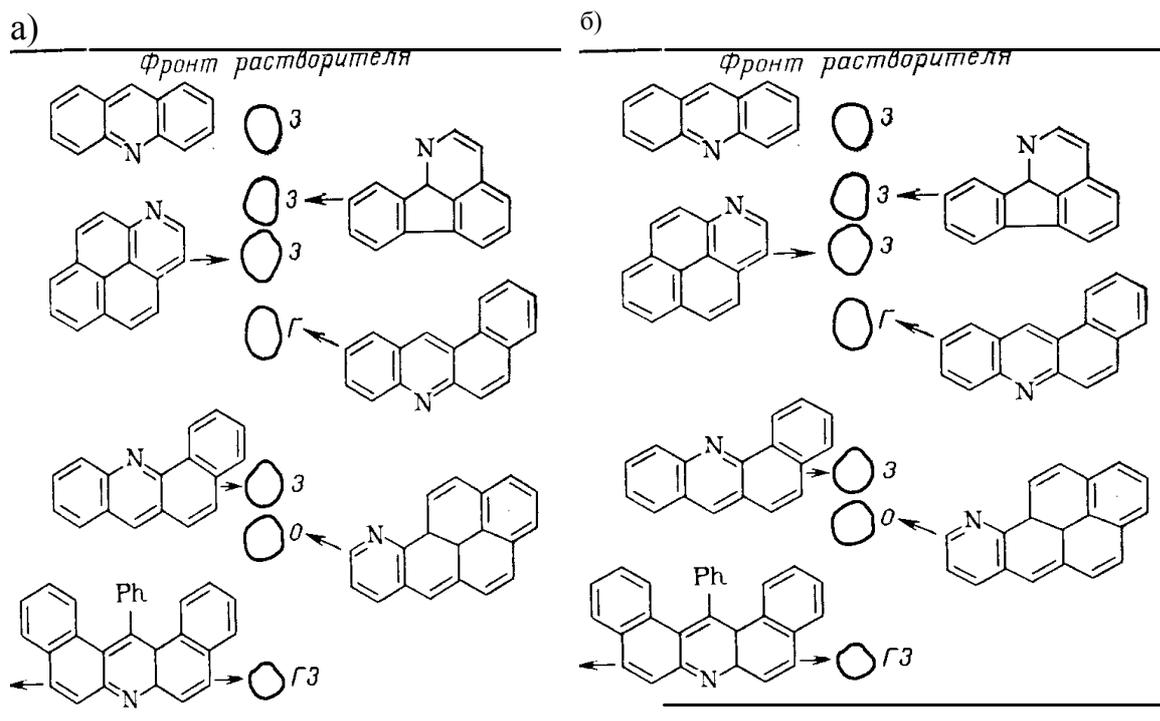


Рис. 36. Хроматограммы, полученные при разделении смесей:

а) азаренов, разделение проводили на целлюлозе при элюировании смесью диметилформаид – вода (35:65); разделение проводили на окиси алюминия при элюировании смесью толуол – эфир (95:5).

Цвета флуоресценции: С – светлый; Г – голубой; Ж – желтый; З – зеленый; О –оранжевый

Таким образом, примеры использования ТСХ для определения токсичных соединений в различных водах, почвах и воздухе подчеркивают важность этого метода для экологического контроля, особенно, с учетом современного аппаратного оформления метода.

5. Капиллярный электрофорез

Метод капиллярного электрофореза (КЭ) основан на разделении компонентов сложной смеси в кварцевом капилляре под действием приложенного электрического поля. Микрообъем анализируемого раствора вводят в капилляр, предварительно заполненный подходящим буфером – электролитом. После подачи к концам капилляра высокого напряжения (до 30 кВ), компоненты смеси начинают двигаться по капилляру с разной скоростью, зависящей в первую очередь от заряда и массы (точнее – величины ионного радиуса) и, соответственно, в разное время достигают зоны детектирования. Полученная последовательность пиков называется электрофореграммой, при этом качественной характеристикой вещества является параметр удерживания (время миграции), а количественной – высота или площадь пика, пропорциональная концентрации вещества. На рис. 37 показана схема установки для капиллярного электрофореза.

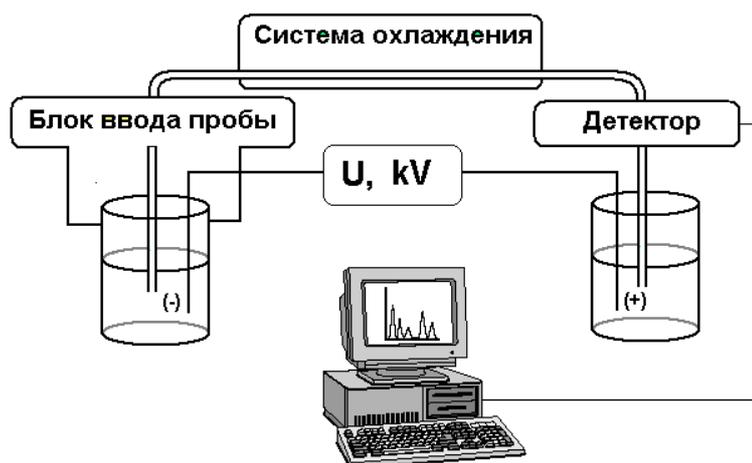


Рис. 37. Схема установки для капиллярного электрофореза

На заряженную частицу в простейшем случае действуют две противоположно направленные силы – электростатического притяжения и сопротивления движению частицы. В равновесных условиях действие этих сил уравнивает друг друга, и скорость миграции частицы определяется выражением:

$$\mu = q \cdot E / 6\pi\eta r \quad (16)$$

где q – заряд иона, а E – напряженность электрического поля. η – вязкость среды, r – радиус частицы

Электрофоретическая подвижность $\mu_{эф}$ определяется как скорость движения частицы, деленная на напряженность электрического поля:

$$\mu_{эф} = v_{эф} / E. \quad (17)$$

где, $v_{эф}$ – скорость идеализированной сферической частицы. В

При проведении разделения в капиллярах особенно важное значение приобретает электроосмотический поток (ЭОП), связанный с движением диффузной части двойного слоя, образующегося относительно заряженной поверхности внутренней стенки капилляра (рис. 38).

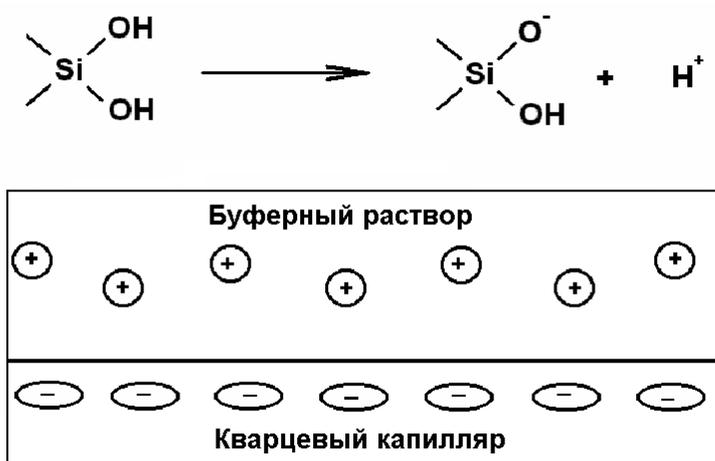


Рис. 38. Схема возникновения электроосмотического потока

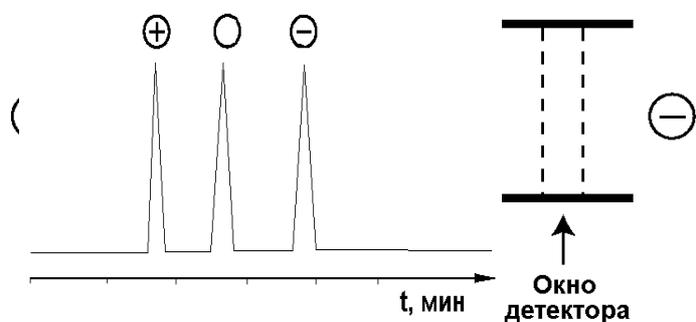
Как правило, заряд поверхности определяется наличием отрицательно заряженных силанольных групп на поверхности

немодифицированных кварцевых капилляров или создается за счет дополнительной модификации поверхности.

Результирующая подвижность частиц μ определяется суммой электрофоретической и электроосмотической подвижностей:

$$\mu = \mu_{\text{эф}} + \mu_{\text{эо}}. \quad (18)$$

Это дает определенные преимущества при анализе смесей противоположно заряженных ионов, поскольку все определяемые компоненты будут двигаться в направлении детектора вследствие ЭОП. Однако скорость передвижения ионов с одинаковым направлением электрофоретической и электроосмотической подвижностей будет увеличиваться, а противоположенным – уменьшаться. Для немодифицированного кварцевого капилляра в диффузной части двойного электрического слоя присутствует некоторая избыточная концентрация



катионов, в результате движения которых возникает ЭОП, направленный к катоду. В результате катионы будут перемещаться быстрее и детектироваться до ЭОП, а анионы медленнее и детектироваться после ЭОП, нейтральные молекулы движутся с ЭОП, как это показано на рис. 39.

а

б

Рис. 39. Движение заряженных частиц в немодифицированном кварцевом капилляре (а) и общий вид электрофореграммы смеси частиц с различными зарядами (б)

Для повышения воспроизводимости КЭ в присутствии ЭОП, электроосмотический поток должен быть постоянным в течение всех проводимых определений, а сохранение постоянства ЭОП часто требует значительных усилий по подготовке до и после работы. В кварцевых капиллярах ЭОП уменьшается при увеличении концентрации электролита и добавлении органических растворителей и возрастает с увеличением pH, а также зависит от вязкости раствора в капилляре и температуры. Если же при добавлении катионных поверхностно-активных веществ (ПАВ) к разделительному буферу на поверхности капилляра адсорбируется положительный заряд (рис. 40), то ЭОП меняет направление и переносит разделительный буфер в направлении анода.

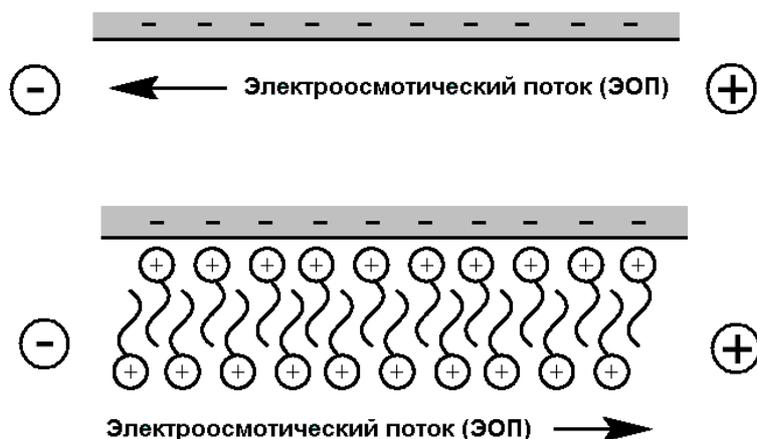


Рис. 40. Изменение направления электроосмотического потока при модификации кварцевого капилляра катионными поверхностно-активными веществами

Уникальной особенностью ЭОП является плоский профиль потока в капилляре. Такой профиль выгоден, поскольку уменьшается размывание зон разделяемых веществ. Следует отметить, что эффективность разделения в капиллярном электрофорезе прямо пропорциональна, а время

анализа – обратно пропорционально напряжению, приложенному к электродам.

Разделение в КЭ может быть выполнено как с положительной, так и отрицательной полярностью электродов. Зная значения pK_a для компонентов пробы, можно выбрать буфер с подходящим значением pH и полярность электродов, чтобы образец двигался в сторону детектора. Скорость миграции зависит от напряженности электрического поля, которая обычно составляет 200-400 В/см.

Варианты капиллярного электрофореза

Существует ряд вариантов капиллярного электрофореза, отличающихся по принципам и механизму разделения.

Капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) является наиболее распространенным вариантом КЭ и предполагает использование одного буфера в качестве разделяющей среды. Разделение компонентов пробы основано на различиях в подвижности заряженных молекул или ионов. Метод находит широкое применение при определении пептидов, белков, аминокислот, лекарственных препаратов, неорганических ионов и многих других объектов.

Капиллярный ионный анализ – это разновидность КЗЭ в которой для определения неорганических ионов, не поглощающих свет в УФ-области спектра, используется косвенное фотометрическое детектирование, достигаемое за счет введения в буфер для электрофореза коионов, поглощающих свет в УФ-области спектра. Вытеснение коионов в зоне определяемого иона уменьшает фоновое поглощение буфера, что выражается в появлении отрицательного пика на электрофореграмме. Так, при разделении катионов используют различные органические основания, например, бензиламин. При определении неорганических анионов в буфер обычно добавляют катионное поверхностно-активное вещество, которое

модифицирует поверхность капилляра и изменяет направление ЭОП. Поскольку направление электрофоретического потока и эндоосмотического потока совпадают, то в этом случае возможны экспрессные и высокоэффективные разделения.

Капиллярная электрокинетическая хроматография основана на разделении нейтральных частиц при их распределении между движущимися в электрическом поле частицами и заполняющим капилляр электролитом. Такое распределение может быть обусловлено действием молекулярных сил, ион-парными взаимодействиями комплексообразованием (лигандный обмен), биоспецифическими взаимодействиями. Имеются следующие разновидности капиллярной электрокинетической хроматографии: мицеллярная, ионообменная, лигандообменная и др.

В мицеллярной капиллярной электрокинетической хроматографии (МКЭКХ) в буферный раствор вводят ПАВ, например, додецилсульфат натрия, что приводит к образованию мицелл, которые будут двигаться к аноду, ЭОП – по направлению к катоду. Разделение основано на различной степени связывания компонентов смеси с мицеллами. Этот метод широко используется для различных классов как нейтральных, так и заряженных соединений, например, фенолов, ароматических аминов и др.

Капилляры для разделения

Подавляющее большинство разделений в КЭ проводят с использованием кварцевых капилляров имеющих внешнее полимерное покрытие, обычно - полиимидное, улучшающее их механическую прочность, и значительно реже полимерные капилляры, например из тефлона. Внутренний диаметр капилляров колеблется в пределах от 25 до 200 микрон, а длина капилляра в зависимости от поставленной задачи - от нескольких сантиметров до 1 метра. Поскольку внешнее полиимидное

покрытие непрозрачно в УФ-области, то участок покрытия удаляют и создают окно для УФ-детектирования. Капилляр закрепляется в специальной пластиковой кассете. Надежное термостатирование капилляра является основным условием получения воспроизводимых времен миграции определяемого соединения и площади результирующего пика, что важно для количественного анализа.

Выбор оптимальных размеров капилляра представляет собой компромиссное решение между требуемой чувствительностью определения и разрешающей способностью. Используют капилляры с внутренним диаметром 25-50 мкм, что является компромиссным решением между достаточно высокой чувствительностью и эффективностью разделения.

Модифицированные капилляры. Первоначально большинство разделений в капиллярном электрофорезе проводили с использованием немодифицированных кварцевых капилляров. Однако, необратимость адсорбции белков, пептидов, фрагментов ДНК, а также электростатические взаимодействия разделяемых соединений с внутренней поверхностью капилляров приводят к значительному снижению эффективности и разрешающей способности, невоспроизводимости разделений. Это требует дополнительных усилий по регенерации капилляров или даже их замене.

Главная цель модифицирования внутренней поверхности кварцевого капилляра состоит в изменении величины и направления ЭОП для улучшения эффективности разделения, а также снижения адсорбции. При этом также достигается ускорение или замедление электросепарационных разделений в зависимости от напряженности и полярности электрического поля; разрешающей способности и чувствительности анализа; движение как анионов, так и катионов в одном направлении, что позволяет проводить их одновременное определение.

Введение проб

Проба может быть введена в капилляр электрофоретическим, электрокинетическим или вытеснительным способом. Объем вводимой пробы не превышает 2 нл, относительное стандартное отклонение составляет 0,03-0,04.

При электрофоретическом вводе пробы, к концам капилляра прикладывается высокое напряжение на фиксированный промежуток времени, при этом входной конец капилляра погружают в раствор пробы. Ионы пробы перемещаются в капилляр пропорционально их электрофоретической подвижности. В случае электрокинетического ввода, компоненты пробы попадают в капилляр за счет комбинации электроэндоосмотического давления и электрофоретической подвижности. Вытеснительный ввод пробы достигается либо за счет создания избыточного внешнего давления инертного газа, приложенного к резервуару с образцом, либо за счет создания вакуума на выходе из капилляра или путем изменения уровня/высоты резервуара, содержащего образец, относительно резервуара с буферным раствором на выходе из капилляра (так называемое гравитационное введение пробы).

Детектирование

Хотя применимость различных вариантов детектирования, включая флуоресцентное, электрохимическое и кондуктометрическое, была показана для КЭ (табл. 26), большинство промышленно выпускаемых приборов оснащено фотометрическими детекторами.

КЭ имеет ряд преимуществ по сравнению с ВЭЖХ:

- высокая эффективность разделения, обусловленная плоским профилем электроосмотического потока;

Таблица 26. Способы детектирования в капиллярном электрофорезе

Детектор	Определяемые соединения	Предел обнаружения, М	Особенности
Фотометрический: прямое детектирование	Ароматические соединения, белки, нуклеиновые кислоты	$10^{-7} - 10^{-4}$	Наиболее широко используется в УФ-области
косвенное детектирование	Ионы металлов, амины, органические и неорганические анионы, сахара	$10^{-8} - 10^{-4}$	Определяют вещества не поглощающие в УФ-области
Флуоресцентный: прямое детектирование	Производные аминокислот, пептиды, белки	$10^{-9} - 10^{-4}$	Необходимо получение производных
косвенное детектирование	Спирты, амины, сахара, неорганические анионы и катионы	$10^{-7} - 10^{-5}$	Применяется к ограниченному кругу объектов
Лазерный флуоресцентный	Производные аминокислот, фрагменты ДНК	$10^{-13} - 10^{-7}$	Используется редко, очень дорог
Амперометрический	Биогенные амины, фенольные соединения	$10^{-8} - 10^{-6}$	Пригоден для капилляров с внутренним диаметром до 2 мкм
Кондуктометрический	Ионы металлов, амины, карбоновые кислоты	$10^{-7} - 10^{-5}$	Трудно менять капилляр
Потенциометрический	Ионы щелочных и щелочноземельных металлов	10^{-8}	Трудность получения ионселективных микроэлектродов
Масс-спектрометрический	Белки, пептиды, мониторинг лекарств	$10^{-10} - 10^{-8}$	Широкие возможности, но высокая стоимость

– экономичность, т.к. практически не требуется применение дорогостоящих высокочистых растворителей (ацетонитрил, метанол, гексан) и малый расход реактивов;

- отсутствие дорогостоящих хроматографических колонок;
- отсутствие дорогостоящих прецизионных насосов высокого давления, необходимых для ВЭЖХ;
- простота аппаратного оформления;
- экспрессность анализа.

Эти преимущества обуславливают широкое использование КЭ для **анализа объектов окружающей среды**. Наиболее часто КЭ используют для определения катионов и анионов в водах. Следует отметить, что разделение одной и той же смеси анионов КЭ занимает существенно меньшее время, чем ВЭЖХ. Электрофореграммы смеси анионов и определения анионов в водопроводной воде показаны на рис. 41.

Эффективно применение этого метода и для определения пестицидов и гербицидов в воде и почве. Примеры разделения приведены на рис. 42 и 43. Метод применим для определения таких опасных экотоксикантов, как фенолы. Электрофоретическое определение фенолов (хлор-, нитро-, метилфенолов) обычно производят методами МКЭЖХ или КЗЭ с обращенным электроосмотическим потоком. Селективность разделения повышают, изменяя рН буфера (область изменения рН 7-10), вводя добавки нейтральных и анионных ПАВ, а также катионных ПАВ совместно с органическими растворителями. В качестве анионной добавки чаще всего используют додецилсульфат натрия, катионной – бромид цетилтриметиламмония, полиэтиленимин, 3,6-ионен. Детектирование фенолов обычно проводят фотометрически на длине волны 190,214 и 280 нм. Предел детектирования с предварительным сорбционным концентрированием составляет 0,3-1 мкг/л. По сравнению с ВЭЖХ повышается эффективность разделения фенолов. Кроме того, гуминовые и фульвокислоты, всегда присутствующие в природных водах, не мешают определению, они отделяются от фенолов с высоким разрешением вследствие различного миграционного поведения.

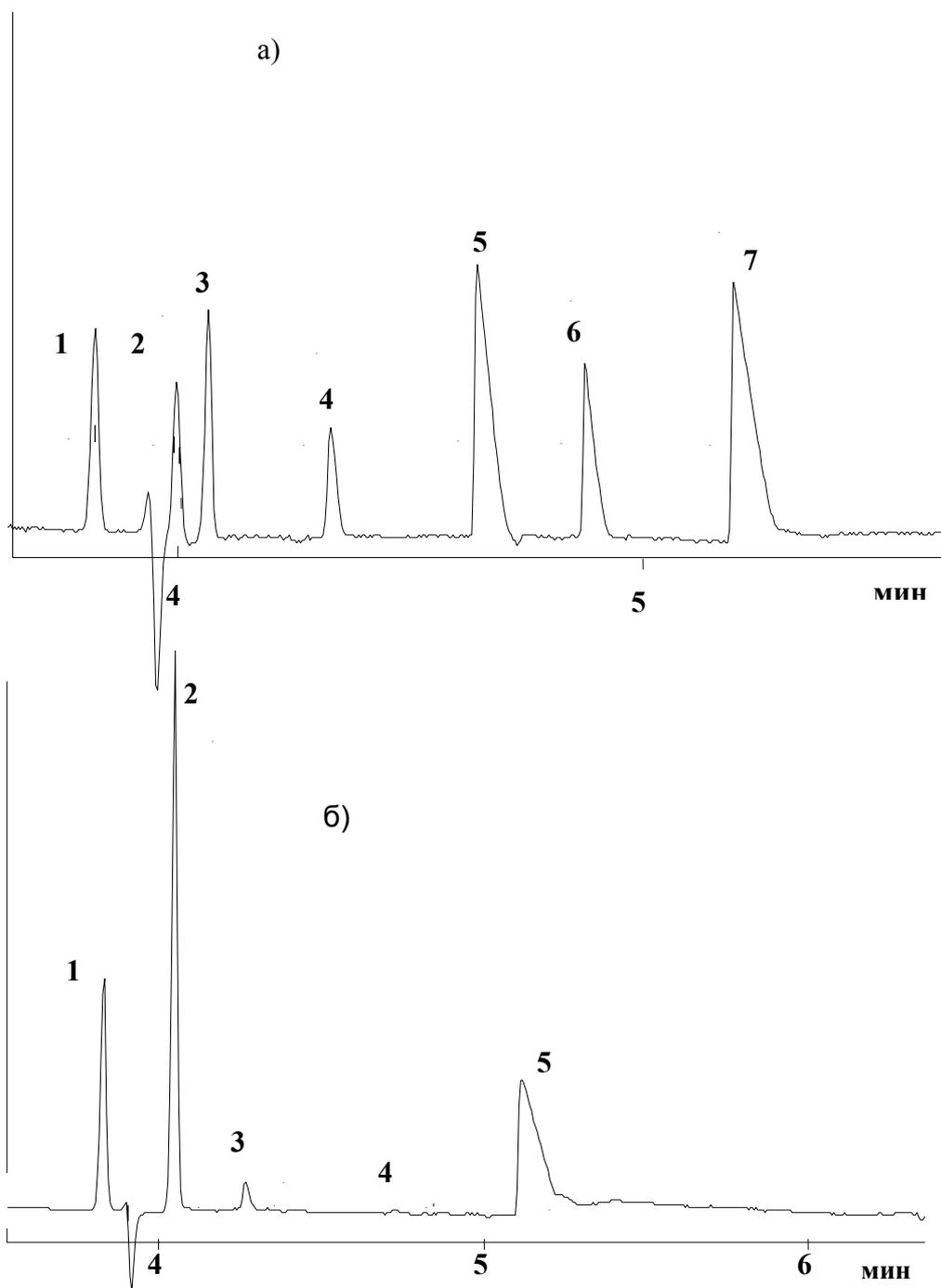


Рис. 41. Определение анионов в воде капиллярным электрофорезом. а) Электрофореграмма градуировочного раствора. Концентрация каждого аниона (кроме гидрокарбоната) – 2 мг/дм³: 1 – хлорид; 2 – нитрит; 3 – сульфат; 4 – нитрат; 5 – фторид; 6 – гидрофосфат; 7 – гидрокарбонат; б) Электрофореграмма водопроводной воды: 1 – хлорид (4,9 мг/дм³); 2 – сульфат (18,1 мг/дм³); 3 – нитрат (1,4 мг/дм³); 4 – фторид (<0,25 мг/дм³); 5 – гидрокарбонат. Рабочее напряжение U= - 17 кВ

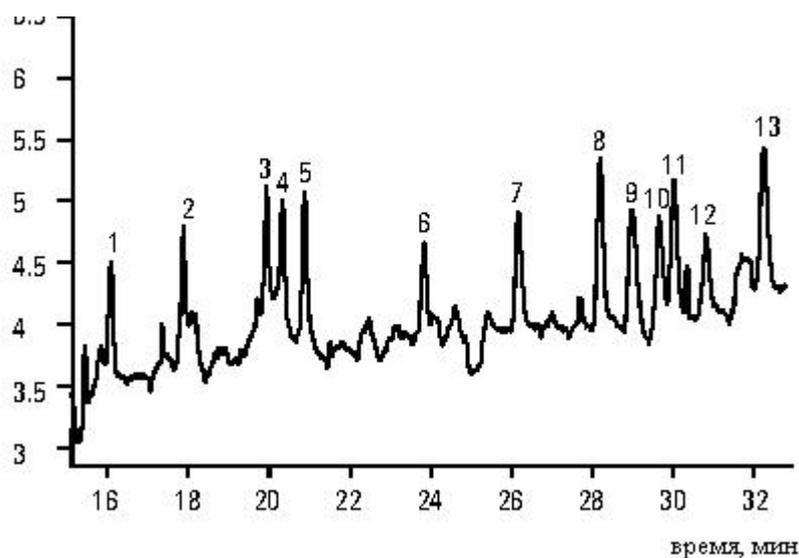


Рис. 42. Электрофореграмма разделения гербицидов: 1- лондакс, 2- квист, 3- эмбер, 4 – флуметсулам, 5 – апбеат, 6 – эцент, 7 – хармони, 9 – просульфурон, 10 –примсульфурон, 11 – элли, 12 – галосульфурон метил, 13 – глеан. Условия проведения анализа: капилляр длиной 102 см и внутренним диаметром 750 мкм; буферный электролит (50 мМ ацетатный буферный раствор, pH 4,75); напряжение 30 кВ; детектор УФ, 240/30 нм

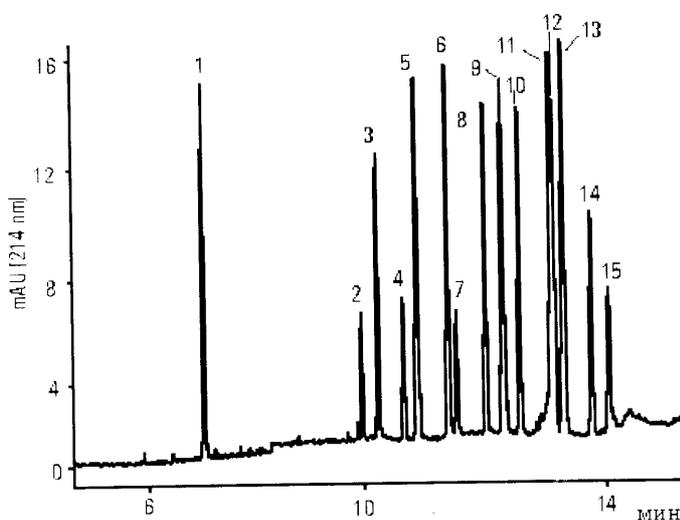


Рис. 43. Электрофореграмма смеси пестицидов: 1– десэтилатразин; 2 – гексазинон; 3 – метоксурон; 4 – монолинурон; 5 – симазин; 6 – цианазин; 7 – мета bromурон; 8 – хлортолурун; 9 – изопротурон и атразин; 10 – диурон; 11 – линурон; 12 – метабензтиазурон; 13 – себутилазин; 14 – тетбутилазин; 15 – металахлор. Условия проведения анализа: капилляр длиной 64,5 см и внутренним диаметром 50 мкм; буферный электролит (12 мМ фосфата, 8 мМ бората, pH 8,9, 100 мМ додецилсульфата натрия); напряженность поля 440 В/см; детектор УФ, 214 нм

Помимо экологического контроля капиллярный электрофорез также используется:

- **в пищевой промышленности:** для определения катионов, анионов в минеральной воде и водке; консервантов, катионов, анионов, витаминов, антиоксидантов, красителей в напитках и соках; витаминов, аминокислот, микотоксинов в различных продуктах; **в фармакологии:** для анализа лекарственных препаратов, для технологического контроля; разделения энантиомеров; **в биохимия и медицине:** для определения белков и аминокислот в биожидкостях гликозилированного гемоглобина и исследования фармакокинетики; **в криминалистике:** для выявления следов взрывчатых веществ и наркотических

6. Практические работы

Работа 1. Газохроматографический метод определения содержания керосина в почвах и водах.

Важной экологической проблемой является контроль загрязнения почвы, поверхностных вод и воздуха различными видами топлива. Поскольку топлива представляют собой сложные смеси углеводородов для их разделения необходимо использовать капиллярные колонки, обладающие высокой эффективностью. Метод газожидкостной хроматографии на капиллярных колонках с пламенно-ионизационным детектором позволяет, как идентифицировать тип топлива, загрязняющего почву и воды, так и оценить его содержание.

Прежде всего, необходимо установить тип нефтепродукта, поскольку их состав может быть очень разным. Задачу идентификации топлив для установления источника загрязнения объектов окружающей среды можно решать, используя прием, названный методом “отпечатков пальцев”. При этом в качестве индивидуальных компонентов более рационально выбирать члены гомологического ряда *n*-парафинов, а группы компонентов - это нафтеновые и ароматические углеводороды, пики которых регистрируются между пиками *n*-парафинов (C_7-C_{10}). Для обнаружения того или иного топлива важно как общее количество пиков на хроматограмме, так и их расположение относительно пиков *n*-парафинов, и, кроме того, соотношение высот пиков различных компонентов.

После установления типа топлива по общему виду хроматограммы проводится оценка содержания топлива, для этого готовятся градуировочные смеси, наиболее целесообразно использовать смеси *n*-парафинов(C_7-C_{12}) в гексане, и по отношению суммы площадей *n*-парафинов(либо площади пика *n*-парафина выбранного в качестве

эталона) на хроматограммах исследуемого образца и стандартной смеси рассчитывают содержание топлива в анализируемом объекте.

Важной проблемой является правильность отбора проб образцов почвы, воды и, главное, возможность изменения состава отобранных проб при хранении. Для точной оценки содержания топлива в почвах и водах необходима их предварительная экстракция гексаном и хроматографический анализ полученного экстракта с использованием капиллярной газовой хроматографии в режиме программирования температуры в интервале от 90⁰С до 120⁰С.

Приборы и реактивы

Газовый хроматограф GC-17 фирмы «Шимадзу» с пламенно-ионизационным детектором.

Колонка капиллярная 30x0,32 мм, толщина пленки 1 мкм неподвижная фаза –95% полисилоксан и 5% фенилполисилоксан.

Температурный режим работы колонки:

начальная 60⁰С в течение 5 мин,

программирование 15⁰С/мин,

конечная 120⁰С в течение 10 мин.

Газ-носитель азот, скорость потока 2,0 мл/мин.

Температура детектора 150⁰С.

Температура испарителя 120⁰С.

Регистрирующая система – програмно-аппаратный комплекс «МультиХром».

Гексан, х.ч..

Гептан, для хроматографии.

Октан, для хроматографии.

Нонан, для хроматографии.

Декан, для хроматографии;

Додекан, для хроматографии.

Образцы керосинов Т-1, РГ-1 и бензина А95.

Стандартные образцы почвы, содержащие топлива Т-1, РГ-1 и бензин.

Механический вибратор.

Выполнение определения. Предварительно готовят раствор смеси предельных углеводородов (C₈-C₁₂) в гексане, с содержанием углеводородов: C₈ – 0,01 C₉-C₁₂ - 0,03 %об. соответственно.

2 мкл раствора вводят в испаритель хроматографа, регистрируют хроматограмму, и определяют времена удерживания предельных углеводородов (t_R). По хроматограмме смеси углеводородов рассчитывают для них число теоретических тарелок (N), коэффициенты селективности (α), разрешение (R_S). Полученные результаты вносят в табл.27.

Таблица 27. Хроматографические параметры углеводородов

Углеводород	t _R , мин	N	α	R _S
Октан				
Нонан				
Декан				
Ундекан				
Додекан				

Готовят образцы почвы с содержанием определенного топлива (Т-1, РГ-1 или бензина) (3-4) мг/г: для чего 4 г почвы помещают в пенициллиновый пузырек с плотной пробкой и добавляют дозатором 100 мкл топлива.

К приготовленному образцу добавляют 10 мл гексана и экстрагируют углеводороды в течение 30 мин, встряхивая на механическом вибраторе. После отстаивания образец фильтруют через бумажный фильтр и трижды хроматографируют по 2 мкл экстракта.

Получают хроматограмму экстракта контрольного образца почвы, содержащего определяемое топливо. Продолжительность анализа 25 мин. Заполняют табл.28 с временами удерживания пиков на хроматограммах, полученных для исследуемого топлива.

Таблица 28. Времена удерживания хроматографических пиков (мин), зарегистрированных на хроматограмме образца топлива.

Номер пика	Время удерживания, мин	Соединение

Берут навеску ~ 4 г исследуемого образца почвы, и извлекают из него углеводороды экстракцией, как описано для контрольного образца почвы.

Получают хроматограмму экстракта, и, после идентификации на хроматограмме пиков предельных углеводородов, проводят количественную оценку содержания топлива в почве, сопоставляя сумму площадей пиков гептана, октана, нонана, декана и додекана на хроматограммах исследуемой почвы и контрольного образца почвы.

Содержание топлива в почве рассчитывают по формуле:

$$c_x \text{ (мг/г)} = c_{ст} \text{ (мг/г)} \times S_x/S_{ст} \text{ (мВ)},$$

где $c_{ст}$ – суммарная концентрация предельных углеводородов в контрольном образце, $S_{ст}$ – суммарная площадь пиков предельных углеводородов на хроматограмме контрольного образца, S_x – суммарная площадь пиков предельных углеводородов на хроматограмме анализируемой почвы.

Работа 2. Определение неорганических ионов в водах методом двухколоночной ионной хроматографии

Одним из параметров, по которому оценивается качество воды, является содержание в ней анионов. Ионная хроматография – наиболее экспрессный и чувствительный метод определения анионов. Порядок элюирования анионов зависит от их заряда и размера гидратированного

иона. Время удерживания анионов возрастает в ряду $F^- < Cl^- < NO_2^- < H_2PO_4^- < Br^- < NO_3^- < SO_4^{2-}$.

Приборы и реактивы

Ионный хроматограф с кондуктометрическим детектором.

Шприц медицинский.

Стандартные растворы фторида, хлорида, нитрита, фосфата и сульфата (100 мкг/мл).

Анализируемый образец воды.

Условия проведения анализа

Разделяющая колонка стальная 100x6 мм.

Неподвижная фаза: анионообменник Хикс зернением 10 мкм.

Подавляющая колонка: стальная 200x6 мм,

заполненная катионообменником КУ-2x8-Н.

Подвижная фаза водный раствор $2,5 \cdot 10^{-3}$ М по Na_2CO_3 и $5,0 \cdot 10^{-4}$ М по $NaHCO_3$

Ввод пробы: петля-дозатор на 20 мкл.

Регистрирующая система – программно-аппаратный комплекс «МультиХром».

Выполнение определения. Предварительно готовят подвижную фазу и дегазируют ее вакуумированием в течение 10-15 мин. Включают ионный хроматограф в сеть и прогревают в течение 30 мин, в это же время через колонку пропускают подвижную фазу для кондиционирования колонки. За “мертвое время” колонки принимают время выхода системного (инжекционного) пика.

Готовят 2 контрольные смеси анионов, содержащие фторид, хлорид, нитрат, нитрит, фосфат и сульфат ионы при концентрации: F^- - 2,5 и 5,0 мг/л; Cl^- - 5 и 10 мг/л; NO_2^- - 10 и 20 мг/л; NO_3^- - 25 и 50 мг/л; PO_4^{3-} - 50 и 100 мг/л; SO_4^{2-} - 25 и 50 мг/л соответственно.

Хроматографируют приготовленные контрольные смеси анионов. Определяют время удерживания, высоту и площадь пиков каждого из анионов.

В хроматограф вводят анализируемый образец воды, и регистрируют хроматограмму. Проводят идентификацию состава образца, и определяют концентрации анионов по формулам:

$$c_X = h_X c_{\text{стандарта}} / h_{\text{стандарта}} \quad \text{или}$$

$$c_X = S_X c_{\text{стандарта}} / S_{\text{стандарта}}$$

По хроматограмме одной из стандартных смеси при оптимальной скорости потока рассчитывают хроматографические параметры (факторы емкости, число теоретических тарелок на колонку и разрешение соседних пиков) разделения смеси

Результаты представляют в виде табл. 29:

Таблица 29. Хроматографические параметры анионов

Анион	t_R , сек	k	N	α	R_S	$S_{\text{пика}}$, мм·сек	$H_{\text{пика}}$, мм
Фторид							
Хлорид							
Нитрит							
Нитрат							
Фосфат							
Сульфат							

Работа 3. Определение фенолов в сточных и природных водах

Весьма распространенными экотоксикантами являются фенол и его хлорпроизводные. Эти соединения образуются в процессе производственной деятельности человека, в частности, в целлюлозно-бумажном производстве. Проведенные исследования показали, что для разделения хлорпроизводных фенола эффективно использовать в качестве подвижной фазы – смеси: (70,0:29,9:0,1) ацетонитрил:вода: H_3PO_4 .

Использование амперометрического детектора в высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет определять фенолы на уровне ПДК, даже в природных водах. В природных водах ПДК для фенола составляет 0,001 мг/л, *n*-хлорфенола – 0,002 мг/л, 2,4-дихлорфенола – 0,004 мг/мл, 2,4,6 – трихлорфенола – 0,006 мг/л и пентахлорфенола – 0,01 мг/л. Установлено, что максимальный сигнал регистрируется при потенциале стеклоуглеродного электрода – 1300 мВ относительно стального электрода сравнения.

В ряде случаев перед хроматографическим разделением фенолов необходимо использование сорбционного концентрирования. Наиболее эффективно сорбционное концентрирование фенолов на промышленно выпускаемых патронах Диапак-фенол. Высокие значения коэффициентов распределения фенолов на сверхсшитом полистироле (ССПС) позволяют практически количественно извлекать фенолы при помощи патронов Диапак – фенол из объемов водных растворов до 1 л. Для подавления диссоциации хлорзамещенных фенола растворы фенолов предварительно подкисляют соляной кислотой до значения рН 2,0 – 2,5. В указанных условиях степень извлечения фенола и его хлорзамещенных составляет 97±5 %.

Количественная десорбция наиболее сильно сорбируемых хлорзамещенных фенолов достигается 4,5 мл ацетонитрила. Более простым способом избежать процедуры размывания хроматографических пиков при определении фенолов в концентрате является разбавление элюата водой или буферным раствором.

Приборы и реактивы

Хроматографическая система, оснащенная насосом высокого давления «Марафон-2» («Аквилон», Россия), скорость подачи элюента 0,5-1,0 мл/мин; дозатором фирмы «Rheodyne», объем вводимой пробы 20 мкл; амперометрическим детектором фирмы «Biotronik» (Германия),

*ячейка – тонкослойная; режим – “DC”, диапазон измерения – 0,1 нА.
Рабочий электрод – стеклоуглеродный,
потенциал рабочего электрода 1000 мВ.
Электрод сравнения – хлоридсеребрянный.
Регистрирующая система – программно-аппаратный комплекс
«МультиХром».
Стальная колонка (150x4,6) мм, заполненная гидрофобизированным
силикагелем Диасорб-110-С₁₆ («Биохиммак», Россия).
Подвижная фаза – (50,0:49,9:0,1) ацетонитрил : вода : Н₃РO₄.
Стандартные растворы фенола, 2-хлорфенола и
2,4-дихлорфенола (100 мкг/мл) в воде.
Концентрирующий патрон Диапак-фенол («Биохиммак», Россия).
Ацетонитрил х.ч. («Криохром», Россия).
Ацетон, х.ч.*

Выполнение определения. Предварительно готовят серию растворов, содержащих смесь фенола, 2-хлорфенола и 2,4-дихлорфенола по (0,05; 0,08; 0,10; 0,15 мкг/мл) в подвижной фазе.

Последовательно хроматографируют все приготовленные растворы, для чего промывают петлю дозатора хроматографа анализируемым раствором, вводят пробу, регистрируют хроматограмму и определяют времена удерживания фенолов и площади их пиков.

По полученным данным строят градуировочные графики зависимости: площадь пика – концентрация, уравнения, которых заносят в табл.30. По одной из хроматограмм рассчитывают основные хроматографические параметры для разделяемой смеси: факторы емкости фенолов, число теоретических тарелок и величину разрешения для соседних пиков и заносят в табл.31.

Проводят определение фенолов в образце водопроводной или сточной воды. Определение фенолов в реальных образцах проводят после предварительного их сорбционного концентрирования на патронах Диапак-фенол, используя следующую методику концентрирования фенолов из водных растворов: предварительно отфильтрованную через

бумажный фильтр пробу воды объемом 50 мл подкисляют 1 М раствором соляной кислоты до pH 2,0-2,5. Концентрирующий патрон Диапак-фенол промывают последовательно 2 мл ацетонитрила и 5 мл дистиллированной воды, после чего прокачивают через патрон пробу воды при помощи шприца или перистальтического насоса со скоростью 3-4 мл/мин.

Патрон после пропускания пробы промывают 1 мл дистиллированной воды, выдавливают шприцем остатки жидкости и элюируют фенолы с патрона 2 мл ацетонитрила (в противотоке) с объемной скоростью не более 1 мл/мин. Полученный элюат разбавляют водой в два раза и трижды хроматографируют.

Таблица 30. Времена удерживания фенольных соединений и уравнения градуировочных зависимостей для них

№	Соединение	Время удерживания, мин	Уравнение градуировочной прямой
1.	Фенол		
2.	2-хлорфенол		
3.	2,4дихлорфенол		

Таблица 31. Хроматографические параметры разделения фенольных соединений

№	Соединение	Фактор емкости	Число теоретических тарелок на колонку	Разрешение
1.	Фенол			
2.	2-хлорфенол			
3.	2,4дихлорфенол			

По полученным хроматограммам идентифицируют в смеси фенол, 2-хлорфенол и 2,4-дихлорфенол, определяют площади их хроматографических пиков.

Содержание фенолов в воде определяют по методу градуировочного графика, используя ранее полученные зависимости. Для повторного использования патрон последовательно промывают водой, ацетоном, водой (по 5 мл).

Работа 4. Разделение анионов методом капиллярного электрофореза

Метод капиллярного электрофореза для определения концентрации неорганических анионов основан на их миграции и разделении под действием электрического поля вследствие их различной электрофоретической подвижности.

Для определения анионов в приборе необходимо установить источник высокого напряжения отрицательной полярности. Тогда электрод на входном конце капилляра будет катодом, а электрод выходного конца – анодом, и анионы будут мигрировать в сторону выходного конца, т.е. к детектору.

Фоновый (ведущий) электролит в случае анализа анионов должен удовлетворять нескольким обязательным условиям:

- он должен быть щелочным, так как большинство определяемых анионов являются анионами слабых кислот и как таковые существуют только в щелочных средах;
- основой электролита должен быть анион, хорошо поглощающий в области рабочих длин волн детектора, так как большинство анионов не обладают собственным поглощением, и их определение может быть проведено лишь косвенным методом;
- должно присутствовать вещество, с помощью которого можно обратить направление электроосмотического потока, т.к. в

противоположенном случае ЭОП, направленный к катоду, резко замедлит электромиграцию анионов к детектору;

– катионный компонент буферного раствора должен быть катионом достаточно сильного основания, и в то же время обладать малой подвижностью, чтобы обеспечить малую электропроводность раствора.

На практике рабочий буферный раствор состоит из смеси диэтаноламина (основание) и хромовой кислоты с добавкой катионного поверхностно-активного вещества бромида цетилтриметиламмония (ЦТАБ). Избыток диэтаноламина создает слабо щелочную среду ($\text{pH} \sim 9$), анион CrO_4^{2-} обеспечивает необходимое светопоглощение, а катион ЦТАБ, сорбируясь на поверхности кварцевого капилляра, перезаряжает поверхность на положительную, чем достигается изменение направления ЭОП.

Порядок выхода анионов следующий: хлорид, нитрит, сульфат, нитрат, фторид, гидрофосфат. После выхода гидрофосфата через некоторое время регистрируется пик гидрокарбоната, который присутствует во всех растворах и может служить признаком и сигналом окончания анализа.

На электрофореграммах как градуировочных, так и анализируемых растворов часто наблюдаются отрицательные пики. Их появление связано с тем, что в анализируемых растворах отсутствуют анионы, которые находятся в растворе фонового электролита. Первый такой пик, связанный с наличием в фоновом электролите бромид-иона, наблюдается между сигналами хлорида и нитрата

Идентификацию и определение анализируемых анионов проводят косвенным методом, регистрируя ультрафиолетовое поглощение на длине волны 254 нм, используя в качестве фонового хроматный электролит.

Приборы и реагенты

Электрофоретическая установка «Капель» со спектрофотометрическим детектором («Люмэкс», Россия) (рис. 44). Капилляр кварцевый длиной 1 м и внутренним диаметром 75 мкм. Ввод пробы давлением (30 мбар, 15 сек).

Регистрирующая система – программно-аппаратный комплекс «МультиХром».

0,5 М раствор NaOH.

1 М раствор HCl.

0,025 М раствор оксида хрома(III).

0,05 М раствор диэтиламина.

Раствор бромидоцетилтриметиламмония(БЦТМА)(3 мг/мл).

Водный раствор аммиака (1:1).

Водный раствор уксусной кислоты (1:9).

0,01 М раствор Трилона Б.

Хроматный рабочий буферный раствор, содержащий

5 ммоль/л хрома(III), 20 ммоль/л диэтиламина и 1,65 ммоль/л БЦТМА.

Стандартные растворы хлорида, нитрата, сульфата, нитрата, фосфата и фторида (100 мг/мл).

Подготовка нового капилляра к работе (выполняется предварительно):

Капилляр промывают в следующей последовательности: раствором соляной кислоты в течение 30 мин, затем дистиллированной водой в течение 30 мин, далее раствором гидроксида натрия в течение 30 мин и затем 60 мин дистиллированной водой. Напоследок капилляр промывают 30 мин хроматным буферным раствором. Проверяют готовность к работе на примере анализа раствора, содержащего хлорид-ион (10 мг/л). Система подготовлена к работе, если пик хлорида имеет симметричный контур.

Ежедневная подготовка капилляра к работе. Перед началом измерений и между ними капилляр промывают следующим образом: 2 мин дистиллированной водой, 1 мин раствором соляной кислоты, 2 мин дистиллированной водой и 3 мин хроматным рабочим буферным раствором. По окончании работы капилляр промывают следующим

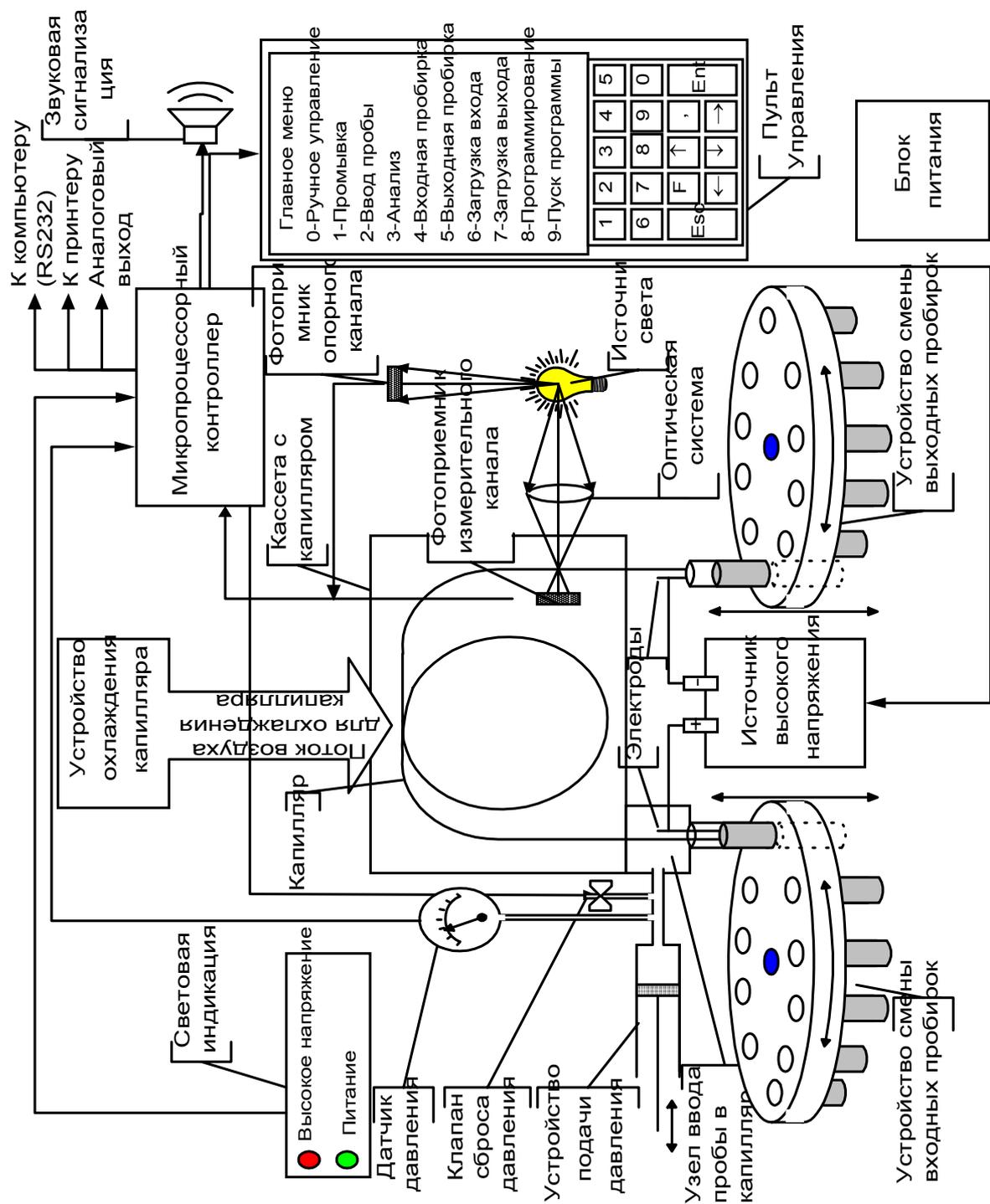


Рис. 44. Блок-схема прибора «Капель 105»

образом: 5 мин дистиллированной водой, 5 мин раствором соляной кислоты, 5 мин дистиллированной водой, после чего выключают прибор.

Выполнение определения. Готовят 5 градуировочных растворов, содержащих смесь определяемых ионов, содержание анионов в растворе приведено в табл.32. Приготовленные растворы помещают в виалы и последовательно анализируют, записывая электрофореграммы. Для регистрации электрофореграмм используют программу «МультиХром», определяют времена миграции анионов, площади их пиков и основные параметры (селективность разделения и разрешение пиков). По полученным значениям площади пиков строят градуировочные зависимости площадь пика – концентрация, уравнения, которых заносят в табл.33. Затем получают электрофореграмму образца водопроводной воды. Проводят идентификацию пиков на электрофореграмме образца водопроводной воды по временам их миграции. Вычисляют концентрацию компонентов в образце водопроводной воды по ранее полученным градуировочным зависимостям, принимая относительную погрешность определения равной 20%. Результаты вносят в табл.34.

Таблица 32. Состав смесей для градуировки системы капиллярного электрофореза

Анион	Концентрация, мг/мл				
	1	2	3	4	5
№					
Хлорид	0,5	1,0	5,0	20	50
Сульфат	20	50	1,0	0,5	5,0
Нитрат	5,0	20	0,5	50	1,0
Фторид	5,0	0,25	10	1,0	20
Фосфат	50	20	5,0	1,0	0,5

Таблица 33. Времена миграции анионов и уравнения градуировочных зависимостей для них

№	Анион	Время миграции, мин	Уравнение градуировочной прямой
1.	Хлорид		
2.	Нитрат		
3.	Сульфат		
4.	Фторид		
5.	Гидрофосфат		

Таблица 34. Результаты анализа образца

Компонент	Время миграции, мин	Площадь пика, mAU*s	Концентрация, мг/л

Работа 5. Разделение катионов методом капиллярного электрофореза

Для определения катионов в приборе используется источник высокого напряжения положительной полярности. Катионы движутся к катоду в том же направлении, что и ЭОП, но быстрее его. На электрофореграмме пики катионных компонентов пробы появляются до системного пика, в связи с этим величина напряжения должна быть не слишком большой, чтобы несколько растянуть во времени запись электрофореграммы.

Чтобы зарегистрировать пики катионов применяют косвенное детектирование. В состав ведущего электролита вводят поглощающий

катион бензимидазола (БИА) в концентрации 0,006 М, которая обеспечивает необходимую оптическую плотность исходного раствора. При разделении катионы пробы эквивалентно замещают в растворе катион БИА, и оптическая плотность в зоне пика уменьшается. Бензимидазол в водном растворе является слабым основанием, pK_a которого равен 5,8. Это означает, что при $pH = 5,8$ в растворе в равных концентрациях находятся молекулярная и катионная формы БИА, а при $pH = 4,8$ концентрация катионной формы в 10 раз превышает концентрацию формы молекулярной. Так как для эквивалентного обмена катионов необходимо, чтобы концентрация катионной формы БИА в электролите была как можно больше, электролит должен быть слабо кислым. Однако в таком случае резко уменьшается скорость ЭОП, а также возрастает общая концентрация электролита, что приводит к возрастанию тока в капилляре. На практике ведущий электролит готовят на основе винной кислоты, анионы которой обладают малой подвижностью и, следовательно, увеличивают сопротивление электролита, а соотношение кислоты и основания подбирают так, чтобы достичь необходимого компромисса между временем анализа и величиной тока.

При электрофорезе катионы регистрируются в последовательности, которая определяется их электрической подвижностью. Первым появляется пик цезия, следом за ним почти с тем же временем выходит пик рубидия. Следующими выходят пики аммония и калия. Их электрические подвижности одинаковы, поэтому без специальных мер, они выходят одним общим пиком. Для разделения аммония и калия в состав ведущего электролита вводят специальную добавку краун-эфира (18-краун-6), который уменьшает электрическую подвижность ионов калия, не оказывая в то же время заметного влияния на подвижность других ионов. В результате становится возможным полное разделение катионов щелочных и щелочно-земельных элементов. Далее, один за другим выходят пики

натрия, магния, лития, стронция, бария и кальция. При анализе природных вод на электрофореграмме могут наблюдаться дополнительные пики, принадлежащие другим катионам, в частности, катионам двухвалентных марганца и железа. Пик марганца выходит вслед за пиком стронция, а пик железа – после пика кальция.

Приборы и реагенты

Электрофоретическая установка «Капель» со спектрофотометрическим детектором («Люмэкс», Россия). Капилляр кварцевый длиной 1 м и внутренним диаметром 75 мкм. Ввод пробы давлением (30 мбар, 15 сек). Регистрирующая система – программно-аппаратный комплекс «МультиХром». 0,5 М раствор NaOH. 1 М раствор HCl. Рабочий буферный раствор, содержащий 6 мМ раствора бензимидазола, 2,5 мМ винной кислоты и 2 мМ 18-крауна-6. Стандартные растворы аммония, калия, натрия, стронция и кальция (50 мг/мл), магния и бария (25 мг/мл).

Выполнение определения. Готовят 3 градуировочных раствора, содержащих смесь определяемых ионов, в интервале концентраций 5 – 25 мг/мл. Приготовленные растворы помещают в вials и последовательно анализируют, записывая электрофореграммы. Для регистрации электрофореграмм используют программу «МультиХром», определяют времена миграции катионов, площади их пиков и основные параметры (селективность разделения и разрешение пиков). По полученным значениям площади пиков строят градуировочные зависимости площадь пика – концентрация, уравнения, которых заносят в табл.35.

Затем получают электрофореграмму образца водопроводной воды. Проводят идентификацию пиков на электрофореграмме образца водопроводной воды по временам их миграции. Вычисляют концентрацию

компонентов в образце водопроводной воды по ранее полученным градуировочным зависимостям, принимая относительную погрешность определения равной 20%. Результаты вносят в таблицу, аналогичную табл.34.

Таблица 35. Времена миграции катионов и уравнения градуировочных зависимостей для них

№	Анион	Время миграции, мин	Уравнение градуировочной прямой
1.	Аммоний		
2.	Калий		
3.	Натрий		
4.	Магний		
5.	Стронций		
6.	Барий		
7.	Кальций		

Работа 6. Определение примесей (никотиновой и γ -аминомасляной кислот) в лекарственном препарате пикамилон

Устойчивость лекарств является предметом постоянной заботы фармацевтов. В последнее время значительное внимание уделяется изучению факторов, которые влияют на стойкость составных частей лекарств и могут её повредить или влияют на качество вспомогательных средств, необходимых для приготовления готовых лекарственных форм. Благодаря скорости определения и простоте приборов тонкослойная хроматография оказывается наиболее употребительным аналитическим

методом при исследовании стабильности лекарственных средств, в частности, при оценке стабильности препаратов, содержащих никотиновую кислоту. Одним из таких препаратов является **пикамилон** – натриевая соль N- никотиноил--аминомасляной кислоты.

Большой интерес клиницистов к пикамилону определяется уникальным сочетанием его фармакологических свойств. Пикамилон улучшает кровоснабжение и функциональное состояние мозга, улучшает микроциркуляцию и гемодинамику глаз, способствует улучшению артериального кровоснабжения внутренних органов. Обладает ноотропными, антигипоксическими и антиоксидантными свойствами; длительно удерживается в тканях организма; малотоксичен. Кроме того, пикамилон оказывает транквилизирующий, не вызывая миорелаксации, сонливости и вялости, и психостимулирующий эффекты, восстанавливает физическую и умственную работоспособность при переутомлении, уменьшает угнетающее влияние этанола на центральную нервную систему.

Препарат назначают при состояниях, сопровождающихся тревогой, страхом, повышенной раздражительностью, показан при астенических состояниях, обусловленных различными нервно-психическими заболеваниями или связанными с повышенным физическим и умственным напряжением; депрессивных расстройствах в пожилом возрасте, сенильных психозах.

При оценке чистоты лекарственного препарата пикамилона в качестве посторонних примесей в нем оценивают содержание никотиновой и γ -аминомасляной (ГАМК) кислот, которое не должно превышать 0,4 и 0,1 % соответственно.

Никотинамид и никотиновая кислота представляют собой две формы витамина B₅. Они широко используются в виде пищевых добавок для человека и животных. Недостаток витамина B₅, в пище приводит к характерным заболеваниям — пеллагре у человека и «чёрному языку» у

животных.

Согласно литературным данным, для разделения никотиамида и никотиновой кислоты с помощью метода ТСХ предложено несколько элюирующих систем: н-пропанол—10%-ный NH_3 (95:5); уксусная кислота—ацетон—метанол—бензол (5:5:20:70); пропанол-2—метанол—хлороформ—10% -ный NH_3 в различных соотношениях. Так как никотиновую кислоту и её амид разделяют на флуоресцентных слоях, обнаружение ведут в ультрафиолетовом свете. Идентифицировать эти соединения можно также действием раствора п-аминобензойной кислоты и парами бромциана. Никотинамид окрашивается в оранжевый, а кислота — в красный цвет.

ГАМК принято считать медиатором торможения ЦНС, она является также нейромодулятором, поддерживающим в нервных структурах баланс между процессами возбуждения и торможения.

При определении ГАМК методом тонкослойной хроматографии используют подвижную фазу: четыреххлористый углерод – метиловый спирт – уксусная кислота (30:7:4). В качестве проявителей для γ -аминомасляной кислоты наиболее часто используют изатин (лиловое окрашивание) и нингидрин (фиолетовое окрашивание).

Реагенты и аппаратура

Пикамилон, 1% раствор в этиловом спирте.

Никотиновая кислота, 0,1% раствор в этиловом спирте.

γ -Аминомасляная кислота, 0,1% раствор в смеси этиловый спирт-вода (1:1).

Нингидрин, 0,2% раствор в этиловом спирте.

Подвижная фаза хлороформ-этанол-уксусная кислота (7,5:1,75:1) или толуол-изопропанол-ацетон-уксусная кислота (7:2:0,5:0,5).

Камера для ТСХ.

Пульверизатор для опрыскивания хроматограмм.

Микрошприц на 10 мкл.

Установка для нанесения проб на пластинку ТСХ – УСП – 1м.

*Фен для сушки пластин для ТСХ.
Сушильный шкаф.
Видеоденситометр Сорбфил.
Пластинки Сорбфил ПТСХ-АФ-В-УФ.*

Выполнение работы. Готовят разбавлением стандартных растворов 2 серии водно–спиртовых растворов: пикамилаона с содержанием 0,1; 0,5; 0,7 и 1,0 %; смеси кислот с содержанием 0,02; 0,03; 0,04 и 0,05 % никотиновой и 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 и 0,05 % и γ -аминомасляной кислот, соответственно.

Для приготовления раствора образца препарата “Пикамилон” 2 таблетки пикамилаона по 0,05 г растирают в ступке и растворяют в 2 мл водно-спиртовой смеси. Полученную взвесь (содержит и вспомогательные вещества: крахмал, магния карбонат основной, сахар, кальция стеарат, тальк) фильтруют через бумажный фильтр.

На пластинке карандашом проводят линию старта на расстоянии 1,5 см от края и закрепляют пластинку на столике ТСХ – УСП-1м, который подогрет до 50⁰С. С помощью микрошприца наносят пробы стандартных растворов пикамилаона(2 мкл), никотиновой и γ -аминомасляной кислот(по 5 мкл) и образца (5 мкл). Нанесение проб может проводиться также автоматически с помощью автоматического аппликатора.

Пластинку с нанесенными пробами помещают в герметичную хроматографическую камеру, куда предварительно наливают 10 мл подвижной фазы. Пластинку выдерживают в камере около получаса, так чтобы фронт растворителя поднялся на 7-10 см. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают феном. Для обнаружения никотиновой кислоты и пикамилаона пластинку просматривают при облучении УФ-излучением при длине волны 365 нм. Для обнаружения γ -аминомасляной кислоты пластинку опрыскивают раствором нингидрина из пульверизатора и нагревают 10-15 мин в сушильном шкафу при температуре 100⁰С до появления окрашенных пятен.

Обработка хроматографических данных. Проявленные пластинки помещают в камеру денситометра и с помощью видеокамеры и системы AverTV Studio вводят запись видеоизображения пластины в память компьютера. Затем в программе видеоденситометра Sorbfil обрабатывают полученный видеоролик. Обработка включает:

1. Расстановку линий старта и фронта
2. Расстановку треков
3. Расчет треков (устанавливается режим сглаживания – по 3 точкам; порог чувствительности – положением рычажка справа; далее выбирают обрабатываемые пики и задают для них вершину, левую и правую границы после этого полученные данные запоминают нажатием клавиши «принять»; ненужные пики удаляют нажатием кнопки «удалить пик») Таким образом проводят обработку всех треков на хроматограмме.
4. Получение отчета: нажимают кнопку «отчет» и записывают результаты расчета треков. Для вывода на экран полученных хроматограмм нажимают кнопку «хроматограмма» и распечатывают их, нажимая кнопку «Print».

Результаты расчетов заносят в табл. 36.

Таблица 36. Значения R_f соединений и уравнения градуировочных зависимостей для них

№	Вещество	Значение R_f	Уравнение градуировочной прямой

По полученным площадям хроматографических пиков для стандартных растворов и контрольной смеси рассчитывают содержание никотиновой и γ -аминомасляной кислот в образце.

Работа 7. Разделение аминокислот методом тонкослойной хроматографии

Разделение аминокислот является важной и распространенной задачей, решаемой методом тонкослойной хроматографии. Возможность разделения аминокислот можно исследовать на примере разделения аргинина, аланина, валина и триптофана, формулы которых приведены в табл.37. :

Таблица 37. Изучаемые аминокислоты

Аминокислота	Формула
Аргинин	$(\text{NH})(\text{NH}_2)\text{CNHCH}_2\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Аланин	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Валин	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
Триптофан	$(\text{C}_8\text{H}_7\text{N})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

Реагенты и аппаратура

Этанольные растворы аминокислот (0,12 мг/мл).

Подвижная фаза изобутанол-изопропанол-вода-уксусная кислота (5:4:3:0.2).

1% раствор нингидрина в этиловом спирте.

Пластинки Сорбфил ПТСХ-АФ-В-УФ.

Камера для ТСХ.

Пульверизатор для опрыскивания хроматограмм.

Микрошприц на 10 мкл.

Установка для нанесения проб на пластинку ТСХ – УСП – 1м.

Фен для сушки пластин для ТСХ.

Видеоденситометр Сорбфил.

Выполнение работы. Готовят разбавлением стандартных растворов 4 серии этанольных растворов аминокислот с содержанием: 0,025; 0,05; 0,075; и 0,10 мг/мл.

На пластинке карандашом проводят линию старта на расстоянии 1,5 см от края и закрепляют пластинку на столике ТСХ – УСП-1м, который подогрет до 50⁰С. С помощью микрошприца наносят пробы стандартных этанольных растворов аминокислот и контрольной смеси по 2 мкл.

Пластинку с нанесенными пробами помещают в герметичную хроматографическую камеру, куда предварительно наливают 10 мл подвижной фазы. Пластинку выдерживают в камере около часа, так чтобы фронт растворителя поднялся на 7–10 см. Затем пластинку вынимают из камеры, высушивают феном. Для обнаружения аминокислот пластинку опрыскивают раствором нингидрина из пульверизатора и нагревают 10–15 мин в сушильном шкафу при температуре 100⁰С до появления окрашенных пятен. Проявленные пластинки помещают в камеру денситометра и с помощью видеокамеры и системы AverTV Studio вводят запись видеоизображения пластины в память компьютера. Затем в программе видеоденситометра Sorbfil обрабатывают полученный видеоролик, как описано в работе 6.

По результатам обсчета хроматограмм заполняют таблицу, аналогичную табл. 36. По полученным площадям хроматографических пиков аминокислот для стандартных растворов и контрольной смеси рассчитывают содержание аминокислот в контрольной смеси.

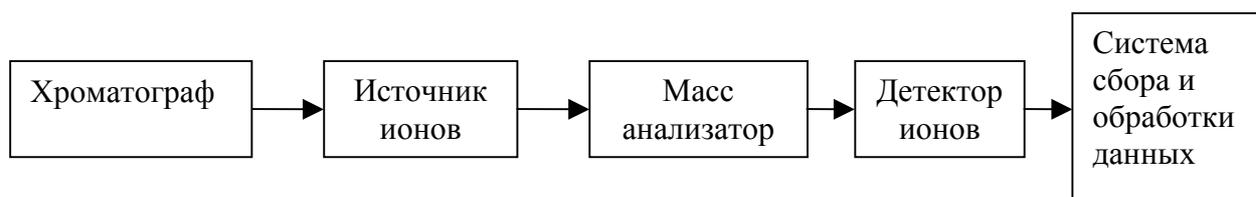
Работа 8. Хромато-масс-спектрометрическое определение органических соединений средней летучести

(задача подготовлена к.х.н., с.н.с. Глазковым И.Н.)

Метод хромато-масс-спектрометрии является одним из наиболее высокоселективных и высокочувствительных методов анализа многокомпонентных смесей органических соединений разной природы. Одной из наиболее простых задач, которую приходится решать этим методом, является определение массовой концентрации заданных

органических соединений средней летучести ($T_{\text{кип.}}$ в диапазоне 200 – 400⁰С) в органических экстрактах. Такие экстракты получаются после соответствующей пробоподготовки, в основном, при анализе объектов окружающей среды (вода и почва). К соединениям средней летучести относятся ряд нормируемых экотоксикантов: фенолы, полиароматические углеводороды, фталаты, хлорбензолы и др.

Блок-схема хромато-масс-спектрометра выглядит следующим образом:



После разделения на хроматографической колонке вещества попадают в камеру ионизации масс-спектрометра. Наиболее старый и широко применяемый метод ионизации — ионизация пучком электронов. Столкновение молекул с электронами приводит к образованию ионов. При этом молекулы часто разваливаются на заряженные фрагменты по определенному для каждого соединения механизму. Процесс ионизации должен происходить в вакууме 10^{-7} - 10^{-6} мм.рт.ст.

После ионизации ионы попадают в масс-анализатор. Наиболее широко распространенный квадрупольный масс-анализатор представляет собой четыре стержня, к которым попарно в противоположной полярности подается определенная комбинация постоянного и радиочастотного переменного напряжений. Ионы, влетающие параллельно оси этих стержней, попадают в гиперболическое поле и, в зависимости от соотношения их массы (точнее, m/z) и частоты, пропускаются этим полем или не пропускаются дальше.

Последним элементом масс-спектрометра является детектор заряженных частиц. Для этой цели используют диодные вторично-

электронные умножители, в которых ион, попадая на первый диод, выбивает из него пучок электронов, которые в свою очередь, попадая на следующий диод, выбивают из него еще большее число электронов и т.д. Другой вариант — фотоумножители, регистрирующие свечение, возникающее при бомбардировке ионами люминофора. Конечным результатом всего этого процесса является масс-спектр, несущий информацию о структуре молекулы.

С помощью системы обработки данных проводят качественную идентификацию по временам удерживания и относительной интенсивности одного основного и двух подтверждающих ионов (m/z) масс-спектра. Количественное определение идентифицированного соединения выполняют методом «внутреннего стандарта», для которого предварительно определяют градуировочный поправочный коэффициент (F), показывающий во сколько раз отклик масс-селективного детектора (площадь хроматографического пика, соответствующая основному для данного конкретного соединения иону m/z) на единицу массы вещества отличается от отклика масс-селективного детектора на единицу масс «внутреннего стандарта». Вещества, используемые в качестве внутренних стандартов, приведены в табл.38.

Реагенты и аппаратура

Хромато-масс-спектрометр фирмы «Финниган», модель Incos 50, состоящий из:

- квадрупольного масс-спектрометрического детектора Incos 50;*
- газового хроматографа Varian 3400, оснащенного капиллярной колонкой длиной 30 м, диаметром 0,32 мм; неподвижная фаза — SE-54, толщина пленки неподвижной фазы — 1 мкм;*
- системы обработки данных Prolab Vector 2.*

Микрошприц емкостью 10 мкл.

Раствор смеси 15 среднелетучих органических соединений в метаноле, концентрация компонентов — 10 нг/мкл.

Раствор смеси 44 среднелетучих органических соединений в метаноле, концентрация компонентов — 10 нг/мкл.

Раствор смеси внутренних стандартов (табл.38), концентрация компонентов – 40 нг/мл.

Раствор декафтортрифенилфосфина в дихлорметане, концентрация 1 мкг/мкл.

Газ-носитель – гелий очищенный марки А.

Метанол, хроматографически чистый.

Таблица 38. Состав смеси внутренних стандартов

Соединение	Формула	Молекулярная масса	Основной ион	Вторичные ионы
1,4-Дихлобензол-d ₄	C ₆ Cl ₂ D ₄	151	152	150, 115
Нафталин- d ₈	C ₁₀ D ₈	136	136	68
Аценафтен- d ₁₀	C ₁₂ D ₁₀	164	164	162, 160
Фенантрен- d ₁₀	C ₁₄ D ₁₀	188	188	94, 80
Кризен- d ₁₂	C ₁₈ D ₁₂	240	240	120, 236
Перилен- d ₄	C ₂₀ D ₁₂	164	164	260, 265

Проверка настройки масс прибора по декафтортрифенилфосфину. Для проверки настройки шкалы масс прибора ввести в инжектор хроматографа в режиме «без деления потока» 1 мкл раствора декафтортрифенилфосфина в метаноле с концентрацией 100 нг/мкл и провести хроматографическое определение в условиях:

Начальная температура термостата	40 ⁰ С
Выдержка	4 мин
Скорость нагрева	10 ⁰ С/мин
Конечная температура термостата	250 ⁰ С
Выдержка	20 мин
Температура испарителя	270 ⁰ С

Вывести масс-спектр декафтортрифенилфосфина, и сравнить полученные значения с допустимыми, представленными в табл.39. Если полученные значения удовлетворяют табличным, то можно проводить дальнейшие измерения.

Таблица 39. Допустимые значения интенсивностей ионов масс-спектра декафтортрифенилфосфина

Масса иона	Относительная интенсивность
51	30-60 % от массы 198
68	<2% от массы 69
70	<2% от массы 69
127	40-60% от массы 198
197	<1% от массы 198
198	основной пик, 100%
199	5-9% от массы 198
275	10-30% от массы 198
365	>1% от массы 198
441	меньше, чем 443
442	>40% от массы 198
443	17-23 % от массы 442

Контроль стабильности градуировочной характеристики. Для определения стабильности градуировочной характеристики прибора для обозначенного преподавателем соединения проанализировать полученный у него градуировочный раствор. Ввести в инжектор хроматографа в режиме «без деления потока» 1 мкл градуировочного раствора и провести определение в условиях:

Начальная температура термостата	40 ⁰ С
Выдержка	4 мин
Скорость нагрева	10 ⁰ С/мин
Конечная температура термостата	270 ⁰ С
Выдержка	20 мин
Температура испарителя	270 ⁰ С
Температура интерфейса ГХ/МС	260 ⁰ С
Диапазон сканирования	50 – 500 а.е.м.
Скорость сканирования	не менее 1 скан/сек

В соответствии с данными табл. 40,41, где приведены массы характеристичных ионов для двух стандартных смесей среднелетучих

Таблица 40. Состав и массы характеристичных ионов 15 компонентной смеси среднелетучих соединений

Соединение	Формула	Молекулярная масса	Основной ион	Вторичные ионы
Фенол	C_6H_6O	94	94	65, 66
2-Хлорфенол	C_6H_5ClO	128	128	64, 130
2-Нитрофенол	$C_6H_5NO_3$	139	139	109, 65
2,4-Диметилфенол	$C_8H_{10}O$	122	122	107, 121
Бензойная кислота	$C_7H_6O_2$	122	122	105, 77
2,4-Дихлорфенол	$C_6H_4Cl_2O$	163	162	164, 98
4-Хлор-3-метилфенол	C_7H_7ClO	142	107	144, 142
2-Метилфенол	C_7H_8O	108	107	108, 77, 79, 90
4-Метилфенол	C_7H_8O	108	107	108, 77, 79, 90
2,4,6-Трихлорфенол	$C_6H_3Cl_3O$	197	196	198, 200
2,4-Динитрофенол	$C_6H_4N_2O_5$	184	184	63, 154
4-Нитрофенол	$C_6H_5NO_3$	139	139	109, 65
4,6-Динитро-2-метилфенол	$C_7H_6N_2O_5$	198	198	51, 105
2,4,5-Трихлорфенол	$C_6H_3Cl_3O$	197	196	198, 97, 132, 99
Пентахлорфенол	C_6HCl_5O	166	266	264, 268

соединений, найти на хроматограмме пики, соответствующие определяемому соединению (задается преподавателем) и внутреннему стандарту. Вывести масс-хроматограммы по основным характеристичным ионам определяемого соединения внутреннего стандарта, получить значения времен удерживания, площадей соответствующих пиков и рассчитать поправочный коэффициент F по уравнению:

$$F_i = \frac{Q_i \times c_{st}}{Q_{st} \times c_i}, \text{ где}$$

Q_i – площадь пика характеристического иона определяемого соединения;

Q_{st} – площадь пика характеристического иона «внутреннего стандарта»;

c_{st} – концентрация «внутреннего стандарта» (40 нг/мкл); c_i – концентрация определяемого компонента в градуировочном растворе (20 нг/мкл). Дальнейшие измерения можно проводить, если выполняется

соотношение: $|F_i - F_{tab}| \leq 0.3F_{tab}$.

Таблица 41. Состав и массы характеристических ионов 44 компонентной смеси среднелетучих органических соединений

Соединение	Формула	Молекулярная масса	Основной ион	Вторичные ионы
Бис(2-хлорэтил) эфир	$C_4H_8Cl_2O$	143	93	63, 95
1,3-Дихлорбензол	$C_6H_4Cl_2$	147	146	148, 111
1,4-Дихлорбензол	$C_6H_4Cl_2$	147	146	148, 111
1,2-Дихлорбензол	$C_6H_4Cl_2$	147	146	148, 111
Бис(2-хлор-изопротил) эфир	$C_4H_{12}Cl_2O$	171	45	63, 95
N-Нитрозоди-н-пропиламин	$C_6H_{14}N_2O$	130	70	42, 101, 130
Гексахлорэтан	C_2Cl_2	236	117	
Нитробензол	$C_6H_5NO_2$	123	77	201, 199
Изофорон	$C_9H_{14}O$	138	82	123, 65
Бис(2-Хлорэтокси)-метан	$C_5H_{10}Cl_2O_2$	173	93	95, 138 95, 123
1,2,4-Трихлорбензол	$C_6H_3Cl_3$	181		

Нафталин	$C_{10}H_8$	128	180	182, 145
Гексахлорбутадиен	C_4Cl_6	260	128	129, 127
Гексахлор- циклопентадиен	C_5Cl_6	272	225 237	223, 227 235, 272
2-Хлорнафталин	$C_{10}H_7Cl$	162		
Диметилфталат	$C_{10}H_{10}O_4$	194	162	127, 164
Аценафтилен	$C_{12}H_8$	152	163	194, 164
2,6-Динитротолуол	$C_7H_6N_2O_4$	182	152	151, 153
Аценафтен	$C_{12}H_{10}$	154	165	63, 89
2,4-Динитротолуол	$C_7H_6N_2O_2$	182	154	153, 152
Диэтилфталат	$C_{12}H_{14}O_4$	222	165	63, 89
Флуорен	$C_{13}H_{10}$	166	149	177, 150
4-Хлорфенил- фениловый эфир	$C_{12}H_9ClO$	204	166 204	165, 167 206, 141
N-Нитрозоди- фениламин	$C_{12}H_{10}N_2O$	198	169	168, 167
4-Бромфенил- фениловый эфир	$C_{12}H_9BrO$	249	248	250, 141
Гексахлорбензол	C_6Cl_6	284	284	142, 249
Фенантрен	$C_{14}H_{10}$	178	178	179, 176
Антрацен	$C_{14}H_{10}$	178	178	176, 179
Ди-н-бутил фталат	$C_{16}H_{22}O_4$	278	149	150, 104
Флуорантен	$C_{16}H_{10}$	202	202	101, 203
Пирен	$C_{16}H_{10}$	202	202	200, 203
Бензилбутилфталат	$C_{19}H_{20}O_4$	312	149	91, 206
Бензо(а)антрацен	$C_{18}H_{12}$	228	228	229, 226
Кризен	$C_{18}H_{12}$	228	228	226, 229
Бис(2-этилгексил)-	$C_{24}H_{38}O_4$	390	149	167, 279

фталаат				
Ди-н-октил фталаат	$C_{24}H_{38}O_4$	390	149	167, 43
Бензо(b)флуорантен	$C_{20}H_{12}$	252	252	253, 125
Бензо(k)флуорантен	$C_{20}H_{12}$	252	252	253, 125
Бензо(a)пирен	$C_{20}H_{12}$	252	252	253, 125
Индено-(1,2,3-cd) пирен	$C_{22}H_{12}$	276	276	138, 227
Дибензо-(a,h) антрацен	$C_{22}H_{14}$	278	278	139, 279
Бензо(g,h,i)перилен	$C_{22}H_{12}$	276	276	138, 277
Азобензол	$C_{22}H_{10}N_2$	182	77	182, 51, 105
N-Нитрозодиметил- амин	$C_2H_8N_2O$	74	42	74, 44

Анализ экстракта. Перед анализом к экстракту добавляют 10 мкл раствора «внутреннего стандарта» с концентрацией компонентов 1 мкг/мкл. Затем полученный раствор (1 мкл) вводят в инжектор хроматографа в режиме «без деления потока», и проводят разделение смеси в условиях, аналогичных условиям для хроматографирования градуировочного раствора. Экстракт анализируют трижды.

Получают масс-хроматограммы для основного характеристического и 2-ух подтверждающих ионов определяемого соединения (данные табл.40,41). Проводят идентификацию определяемого соединения по следующим критериям:

- характеристические ионы для определяемого компонента должны давать максимальное значение в любом выбранном скане рассматриваемого пика;

- время удерживания рассматриваемого пика не должно отличаться не более, чем на 30 сек от времени удерживания подлинного соединения;
- относительная интенсивность пиков 3-х характеристичных ионов в рассматриваемом масс-спектре не должна отличаться более чем на 20% от относительной интенсивности этих пиков в масс-спектре истинного соединения, полученного для калибровочного раствора.

Далее проводят оценку определяемого вещества в экстракте. По масс-хроматограмме определяют площадь пика основного характеристичного иона для определяемого соединения и соответствующего внутреннего стандарта. Результаты измерений заносят в табл.42.

Таблица 42. Результаты определения компонента в органическом экстракте

№ определения	Площадь характеристичных ионов		Концентрация определяемого компонента	
	Определяемого соединения Q_i	Внутреннего стандарта Q_{st}	В пробе, нг/мкл	Среднее значение, нг/мкл
1	Q_1	Q_{st1}	c_{i1}	\hat{c}_i
2	Q_2	Q_{st2}	c_{i2}	
3	Q_3	Q_{st3}	c_{i3}	

Вычисляют концентрацию определяемого соединения в экстракте по формуле: $c_i = \frac{Q_i \times c_{st}}{Q_{st} \times F_i}$. Рассчитывают величину доверительного интервала, принимая $P=0,95$, и представляют результат (концентрация соединения в экстракте) в виде: $c, \text{ нг/мкл} = \hat{c}_i \pm \Delta$.

7. Особенности эксплуатации колонок для ВЭЖХ

Хроматографическая колонка является главным узлом хроматографической системы. При возникновении проблем с разделением часто бывает очень сложно определить, связаны ли они с самой колонкой или другими элементами хроматографической системы. Вместе с тем, причины проблем ищут в первую очередь в состоянии колонки, хотя в большинстве случаев эти проблемы вызваны другими факторами, например, изменениями состава подвижной фазы (ПФ), ее расхода, колебаниями температур в системе и окружающей среде, различием образцов и т.д. При возникновении проблем, приводящих к неисправности колонки, необходимо предпринять своевременные грамотные действия по устранению причин, чтобы избежать этого в будущем.

7.1. Подготовка растворителя и пробы

Способ подготовки растворителя для ВЭЖХ зависит от того, какого качества растворитель имеется в наличии и для каких задач предполагается его использовать. Имеет значение также устойчивость растворителя к действию тепла, света и кислорода воздуха. Если используют растворители высокой чистоты, например, перегнанные в стеклянной аппаратуре, специально очищенные для ВЭЖХ и профильтрованные через фильтр с порами диаметром 0.5 мкм, их подготовка для работы проста: готовят смесь растворителей нужного состава, как правило, смешением по объему и дегазируют ее тем или иным способом. Если используют растворитель более низкого качества, в особенности технический, его подвергают нескольким дополнительным стадиям очистки: перегонке или ректификации в стеклянной аппаратуре, часто с предварительной химической обработкой, осушкой и с обязательным фильтрованием перед дегазацией через фильтр с порами

диаметром 0.2 – 0.5 мкм. Пригодность подготовленного растворителя проверяют непосредственно на хроматографе в диапазоне чувствительности и расходов, с которыми предстоит работать. Недостаточную чистоту растворителя устанавливают по шумам нулевой линии, превышающим допустимые, по большому дрейфу нулевой линии, по невозможности отрегулировать нулевое положение регистрирующего устройства на чувствительных шкалах детектора. Такая проверка особенно важна при работе в градиентном режиме, для которого необходимы растворители наиболее высокого качества.

Выделяющиеся из недеаэрированной ПФ пузырьки воздуха приводят к нестабильности нулевой линии детектора, ухудшают эффективность колонок для эксклюзионной хроматографии, заполненных полужесткими гелями, могут вызвать окисление лабильных соединений и некоторых привитых фаз. Поэтому необходима деаэрация ПФ. Ее проводят кипячением, продувкой гелием, воздействием вакуумом или ультразвуком.

Особенности работы с водными растворителями

Вода и элюенты, готовящиеся на ее основе, нуждаются в особом внимательном отношении, так как вода очень легко загрязняется, поглощая газы и летучие вещества из воздуха лабораторного помещения. Некоторые водные растворы, особенно буферные фосфатные, являются питательной средой, в которой быстро размножаются многие бактерии, образуя частицы колоний. Эти частицы способны засорять фильтры, нарушать работу клапанов, портить колонки и т.д. Дегазированные водные растворы очень быстро поглощают кислород и воздуха. Следует, как правило, использовать для ВЭЖ свежеприготовленную бидистиллированную воду. Приготовив растворитель, следует дегазировать его, отфильтровать и затем быстро использовать.

Если растворитель стоял некоторое время, его нужно перед работой проверить его на отсутствие взвесей и опалесценции, профильтровать и дегазировать. Лучше всего готовить и использовать растворитель в количестве, необходимом на день работы.

Подготовка раствора пробы

Раствор пробы, как правило, нужно готовить в том же растворителе, который используют для работы. Этот способ является наилучшим, так как не дает (или почти не дает) ложных пиков на хроматограмме, связанных с вытеснительными пиками, прохождением через детектор другого растворителя и откликом детектора на изменение при этом показателя преломления.

Если в пробе присутствуют нерастворимые примеси (соли, полимеры и др.), анализ которых не представляет интереса, такие пробы после растворения должны быть профильтрованы через фильтр с порами 0.2 – 0.5 мкм под вакуумом или, что более удобно, под давлением; можно отделять твердые частицы на центрифуге.

Если пробу не удастся приготовить из компонентов рабочего растворителя из-за плохой растворимости образца, следует попытаться подобрать растворители, используя литературные данные по растворимости или метод проб и ошибок. Важно, чтобы этот растворитель был совместим с ПФ. Когда растворитель выбран, всегда до того, как ввести приготовленный раствор пробы, сделайте холостой тестовый ввод такого же объема выбранного растворителя, но без растворенного образца. Это дает возможность оценить, какие ложные пики при вводе растворителя будут образовываться. Наконец, следует ввести раствор образца в этом растворителе. Если растворитель сильно отличается от того, который используют для элюирования, то кроме образования ложных пиков возможно выпадение части образца в осадок в колонке или

инжекторе, когда проба смешивается с элюентом. Иногда при смешивании таких разных растворителей существенно падает эффективность разделения или возможно даже исчезновение пиков компонентов пробы.

7.2. Типичные неисправности, способы обнаружения и устранения

В табл. 43 –47 приведены наиболее общие проблемы, приводящие к неисправности колонки, вместе с возможными причинами и способами их грамотного устранения. Обращаясь к данной таблице, вы сможете точно определить причину неисправности и устранить её. Если в системе слишком высокое давление, необходимо последовательно двигаясь от насоса к колонке, найти место засорения и устранить его.

Таблица 43. Проблема – существенное изменение времени удерживания одного и того же пика (более чем на 10%).

Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнение колонки.	Промойте или замените колонку.
2. Потеря привитой фазы	Замените колонку
3. Колонка не уравновешена.	Промойте колонку подвижной фазой объемом не менее семи геометрических объемов колонки.
4. Колонка перегружена.	Уменьшите количество вводимого образца.
5. Изменился расход подвижной фазы	Проверить расход элюента
6. Изменился состав подвижной фазы	Заменить элюент
7. Изменилась температура	Проверить термостат

Таблица 44. Проблема – слишком высокое давление в системе

Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнён входной фрит колонки.	Промойте колонку медленным обратным потоком подвижной фазы (в 5-6 раз меньшим, чем рабочий прямой поток) для удаления механических частиц или замените входной фрит.
2. Загрязнён фильтрующий элемент "in-line" фильтра (предколоночного фильтра) между инжектором и колонкой.	Замените фильтр.
3. Загрязнена предколонка.	Замените предколонку.
4. Используется колонка с малым внутренним диаметром.	Уменьшите расход подвижной фазы.
5. Колонка набита сорбентом с малым размером частиц.	Используйте более короткую колонку.
6. Неисправен манометр, тензопреобразователь	Проверьте давление другим манометром, замените указатель давления.
7. Загрязнено устройство ввода пробы	Промыть или заменить инжектор
8. Забит капилляр	Заменить капилляр
9. Загрязнена ячейка детектора.	Промыть ячейку детектора
10. Увеличилась объемная скорость	Проверить расход элюента

Таблица 45. Проблема – снижение эффективности колонки (числа теоретических тарелок)

Возможная причина	Необходимые действия
1. В колонке образовалось пустое пространство (проседание сорбента или образование канала).	Замените колонку.
2. "Износилась" предколонка.	Замените предколонку.
3. Экстраколоночные эффекты (повреждение или неправильная установка фитингов и соединений)	Минимизировать факторы, вызывающие эффекты, проверить и переустановить соединения
5. Увеличение объёма вводимого образца	Проверить систему или программу ввода образца
6. Растворение образца в другом, более сильном по элюирующей способности, чем подвижная фаза, растворителе	Изменить пробоподготовку
7. Изменения в составе подвижной фазы	Заменить подвижную фазу

7.3. Методические аспекты обеспечения высокой эффективности колонки

Большинство пользователей хроматографических колонок хотели бы максимально продлить срок службы этого важнейшего элемента хроматографа. Рассмотрим три основные причины выхода из строя наиболее распространённого на сегодняшний день типа колонок - колонок, заполненных обращённо-фазовыми сорбентами.

Первая причина - *потеря химически привитой фазы*. В настоящее время около 90% всех анализов методом ВЭЖХ выполняются на химически привитых фазах. Разрушение химических связей между привитыми группами и силикагельной матрицей приводит к изменению времён удерживания и разрешения, а также к тому, что пики "хвостят". Причина - гидролиз силоксановых связей силикагелевой матрицы с привитыми группами или эндкэпирующим реагентом, применяемым для устранения влияния

Таблица 46. Проблема – раздвоение пиков, наличие «хвостов» у пиков

Возможная причина	Необходимые действия
1. Загрязнена колонка.	Промойте или замените колонку.
2. Входной фрит колонки забит механическими примесями.	Замените входной фрит колонки.
3. Потеря привитой фазы.	Замените колонку.
5. Проседание сорбента.	Замените колонку.
6. Образование канала в сорбенте.	Замените колонку.
7. Износилась предколонка.	Замените предколонку.
8. Экстраколоночные эффекты (повреждение или неправильная установка фитингов и соединений)	Минимизировать факторы, вызывающие эффекты, проверить и переустановить соединения
9. Колонка перегружена	Уменьшить объем вводимой пробы
10. Изменения состава подвижной фазы (концентрации буферного раствора, рН, количества ион-парного реагента и т.д.)	Замените подвижную фазу
11. Компоненты пробы выпадают в осадок	Изменить пробоподготовку, состав подвижной фазы
12. Изомеризация, диссоциация, таутомерные превращения компонентов пробы	Изменить состав подвижной фазы

остаточных силанольных групп на поверхности силикагеля. Гидролиз наиболее ярко выражен при использовании подвижных фаз с $pH < 3$. При использовании таких подвижных фаз следует использовать специально предназначенные для этого колонки (в том числе и с силикагельной матрицей), например, обращённо-фазовые колонки серии Luna фирмы Phenomenex. При работе вблизи нижней границы данного диапазона следует избегать повышения температур подвижной фазы выше 60 °С.

Таблица 47. Проблема – наличие неидентифицируемых («лишних») пиков

Возможная причина	Необходимые действия
1. Проба содержит примеси, не предусмотренные методикой анализа	Проверить калибровку, проанализировать стандартные образцы.
2. Загрязнена колонка.	Промойте или замените колонку.
3. Износилась предколонка.	Замените предколонку.
4. Загрязнен инжектор	Промойте инжектор
5. Загрязнена подвижная фаза	Замените элюент
6. Воздушные пузырьки в системе	Деаэрировать элюент

Вторая причина – образование пустого пространства на входе в колонку, вызванное проседанием сорбента. Это приводит к резкому снижению эффективности колонки (резкому уменьшению числа теоретических тарелок N), а также ухудшению разрешения, увеличению размывания пиков, их расщеплению на дублеты и появлению "хвостов". Причинами проседания могут быть: а) повышенное (более допустимого) давление на входе в колонку или гидравлический удар (одна из наиболее часто встречающихся причин), вызванный резким сбросом давления; б) плохо набитые колонки, "проседающие" в процессе использования; в) в

результате использования подвижных фаз с высоким значением рН произошло растворение силикагеля в колонке. Для предотвращения этого следует поддерживать в системе давление, не превышающее 17-19 МПа. Не допускайте скачков давления. Помните, что при смене колонки или ПФ необходимо дождаться снижения давления до 1 – 1.5 Мпа и только после этого приступать к демонтажу колонки и промывке системы. При проседании сорбента колонки, вызванном гидравлическим ударом (сорбент на входе проседает обычно более чем на 1-2 мм), хроматографические параметры ухудшаются скачкообразно. В этом случае производитель (поставщик), как правило, не несет гарантийных обязательств, так как подобные действия являются грубейшим нарушением условий эксплуатации *любой* (не только обращенно-фазовой) колонки для жидкостной хроматографии. При использовании подвижной фазы с рН >7, её температура не должна превышать 40°C во избежание растворения силикагелевой матрицы. При необходимости применения щелочных подвижных фаз (рН >7) используйте специально предназначенные для этого силикагелевые колонки (обращенно-фазовые колонки серии Luna фирмы Phenomenex способны стабильно работать вплоть до рН=10) или же колонки на полимерной основе. Для остальных колонок рН подвижной фазы не должен превышать 7.

Третьей причиной неисправности колонки может стать очень прочное удерживание на привитой фазе отдельных компонентов пробы или подвижной фазы. Это приводит к ухудшению разрешения и изменению времён удерживания пиков. Это также может пагубно повлиять на форму пиков. Механические примеси и выпавшие в осадок компоненты пробы или соли буферных растворов также могут испортить колонку, забивая входной фрит или сорбент. Причины загрязнения колонки: а) проба содержит компоненты, не смываемые с колонки подвижной фазой данного состава. Это часто наблюдается при

использовании подвижных фаз с малым содержанием органического компонента; б) примеси в подвижной фазе адсорбируются на неподвижной фазе колонки. Это часто происходит при использовании ион-парных реагентов или других добавок в сочетании с подвижной фазой с малым содержанием органической составляющей и изократическим режимом элюирования; в) механические примеси в пробе или подвижной фазе, забивающие входной фритт колонки.

Для предупреждения этой ситуации, требуется очистка образца перед инъекцией, подразумевающая фильтрацию или центрифугирование пробы для удаления механических примесей и твердофазную экстракцию для удаления высоко удерживаемых компонентов пробы. Используйте только особо чистые растворители и реактивы для подвижной фазы и не забывайте фильтровать буферные растворы. По возможности откажитесь от применения ион-парных реагентов, в качестве ион-парных реагентов при работе на обращенной фазе не используйте вещества, содержащие в углеродных цепях более восьми атомов углерода (например, применение тетрадециламмоний бромида приводит к его необратимой сорбции на обращенной фазе). Для того чтобы смыть высоко удерживаемые примеси с неподвижной фазы колонки промойте её в течение продолжительного времени сильным растворителем (таким как 100% ацетонитрил). Поместите в линию между инжектором и колонкой предколонку, которая будет адсорбировать несмывающиеся компоненты и защищать аналитическую колонку. Не забывайте своевременно менять предколонки.

Правила эксплуатации нормально-фазовых колонок аналогичны изложенным в табл. 48. Они более требовательны к процедуре регенерации, колонки для НФХ так же не рекомендуется хранить в сухом виде.

Для продления службы аналитической колонки применяют так называемые предколонки. Основная роль, которую играет предколонка в

хроматографической системе – роль ловушки сильно удерживающихся на аналитической колонке примесей и механических частиц. Она устанавливается в линии между инжектором и аналитической колонкой. Защищая при помощи предколонки свою аналитическую колонку, можно существенно продлить срок ее службы. При этом важное значение имеет своевременная замена износившейся предколонки. Несмотря на то, что точно определить необходимость замены предколонки при работе с данным образцом и подвижной фазой можно лишь при наличии соответствующего опыта, существует несколько количественных параметров, способствующих принятию верного решения. Среди них – число теоретических тарелок N , рабочее давление P и разрешение R_s . Если N , P или R_s изменились более чем на 10%, необходимо заменить предколонку.

Таблица 48. Правила эксплуатации обращенно-фазовой колонки

<p>Сводите к минимуму скачки давления в хроматографической системе</p>	<p>Ввод пробы осуществляйте резким поворотом ручки инжектора для снижения гидравлического удара. Обеспечьте наименьшую пульсацию насосов, вызванную, как правило, непостоянной объёмной скоростью подвижной фазы (фаза не дегазирована). Избегайте гидравлических ударов.</p>
<p>Используйте предколонку или "in-line" фильтр с диаметром пор 0.5 мкм.</p>	<p>Подсоедините их в линию между инжектором и аналитической колонкой. Фильтр задержит крупные механические частицы, а предколонка предотвратит попадание сильно удерживаемых примесей на аналитическую колонку.</p>

<p>Как можно чаще промывайте колонку сильным растворителем.</p>	<p>Обычно бывает достаточно промыть колонку 100% ацетонитрилом. Тем не менее, если необходим более сильный (менее полярный) растворитель, то можно применить метиленхлорид, являющийся одним из наиболее сильных растворителей в обращённо-фазовой хроматографии. При промывке помните о совместимости растворителей и возможности образования осадков. Многие сильные органические растворители не смешиваются с водными подвижными фазами и буферами, поэтому до и после использования метиленхлорида необходимо промыть колонку пропан-2-олом.</p>
<p>Перед вводом "грязной" пробы в колонку необходимо провести пробоподготовку для удаления механических частиц и сильно удерживающихся на колонке примесей.</p>	<p>В качестве пробоподготовки используйте такие приёмы, как твердофазная экстракция, фильтрация через пористый фильтр и центрифугирование</p>
<p>Колонки на силикагелевой основе используйте с подвижными фазами, рН которых лежит в диапазоне от 3 до 7.</p>	<p>Для работы за пределами данного диапазона используйте специально предназначенные для этого силикагелевые колонки или колонки на полимерной основе</p>
<p>При работе с буферными растворами используйте только свежеприготовленные буферы. Если это невозможно добавляйте в ёмкость 100 - 200 мг/л азид натрия для предотвращения роста бактерий.</p>	<p>Долго стоящие водные растворы быстро "зацветают", что приводит к нестабильности базовой линии и загрязнению колонки. Помните, что азид натрия очень ядовит и по токсичности сопоставим с цианидами.</p>
<p>Перед хранением или транспортировкой колонки отмойте её от солей и буферных растворов и оставьте в чистом ацетонитриле</p>	<p>Кроме того, ацетонитрил является хорошим растворителем для хранения, в отличие от водных и спиртовых смесей, способных ускорять гидролиз неподвижной фазы.</p>

Несмотря на то, что вышеперечисленные параметры являются достоверными критериями принятия решения о замене предколонки, нельзя быть на сто процентов уверенным в том, что предколонка должным образом защищает аналитическую колонку. Аналитическая колонка может загрязняться из-за перенасыщения предколонки и без видимого изменения вышеперечисленных параметров. Поэтому лучше произвести замену предколонки как можно раньше. В отсутствии иной информации хорошей привычкой является замена предколонки после 150 вводов пробы или 1000 объёмов подвижной фазы.

7.4. Проблемы изменения селективности колонок

При переходе на новую колонку могут возникнуть нежелательные эффекты ухудшения селективности. Изменения селективности колонки могут быть вызваны изменениями взаимодействия компонентов пробы с химически привитой фазой или силикагелевой матрицей сорбента. Удерживание зависит от длины химически привитых алкильных групп (C_{18} , C_8 и т.д.) и степени покрытия ими матрицы. Также возможны взаимодействия между компонентами пробы и активными силанольными центрами или примесями металлов на поверхности силикагелевой матрицы. Примеси металлов увеличивают кислотность силикагеля, в результате чего остаточные силанольные группы депротонируются даже при низких значениях pH и сильно взаимодействуют с основными веществами. Незначительные изменения матрицы могут вызвать кардинальные изменения селективности, а также формы пиков, в особенности у основных соединений.

Большие различия значений фактора разделения α ($>10\%$) для двух гидрофобных соединений, например, антрацена и нафталина указывают на различия привитой фазы. Большие различия селективности для

гидрофобного и полярного веществ основной природы (например, толуола и диметиланилина) указывают на различие свойств матрицы сорбента.

Таблица 49. Параметры, по которым контролируют изменения качества колонки

Число теоретических тарелок, N	Наиболее частыми причинами уменьшения числа теоретических тарелок являются образование полостей в колонке и её загрязнение. Пики на хроматограмме становятся шире, эффективность падает. Проверая число N , можно обнаружить проблемы ещё до того, как они повлияют на разделение.
Фактор удерживания, k	Изменение фактора удерживания при одних и тех же условиях хроматографирования указывает либо на смывание химически привитой фазы с колонки, либо на загрязнение колонки несмываемыми примесями. Изменения k могут быть вызваны изменениями состава подвижной фазы, что часто приводит к ошибочному мнению о неисправности колонки.
Селективность, α .	Изменение селективности является ещё одним свидетельством, наряду с фактором удерживания, смывания привитой фазы, загрязнения колонки или изменения состава подвижной фазы.
Коэффициент асимметрии, A_s .	Коэффициент асимметрии является мерой симметричности пика. Увеличение коэффициента асимметрии (появление "хвоста") пика указывает на возможное образование полости в колонке, но также может быть вызвано взаимодействием полярного образца с силанольными группами силикагеля в результате смывания привитой фазы.
Обратное давление колонки, ΔP	Увеличение обратного давления колонки указывает, как правило, на то, что входной фрит забился механическими частицами. Резкое увеличение обратного давления может быть также вызвано образованием полости в результате разрушения упаковки колонки.

Возникновение проблем с селективностью в случае полярных слабоосновных и слабокислых веществ, как правило, вызвано некорректным вводом образца (образец растворен не в подвижной фазе, рН и ионная сила раствора не обеспечивают полного протонирования или депротонирования исследуемых компонентов и т.д.). В некоторых случаях изменение селективности связано с влиянием остаточных активных силанольных групп сорбента. Для его устранения следует установить рН подвижной фазы около 3 или добавить в элюент 10-50 мМ триэтиламина (ТЭА). Это позволит "закрыть" остаточные силанольные группы на поверхности силикагелевой матрицы. Все эти действия значительно улучшат воспроизводимость анализа при смене колонок для таких веществ. Оптимальным же решением в данном случае было бы использование специальных колонок со сверхочищенной силикагелевой матрицей и двойным покрытием функциональными группами (например, колонки Luna C18(2) или C8(2) фирмы Phenomenex), обеспечивающими уникальную воспроизводимость при анализе полярных соединений. Изменения селективности за счёт привитой фазы могут быть устранены при помощи варьирования силы элюента (содержания органического компонента).

7.5. Проблемы воспроизводимости между параллельными вводами пробы

Если время удерживания (T_R) или разрешение (R_s) пиков не воспроизводятся от анализа к анализу и даже ото дня ко дню, то точность данного ВЭЖХ метода не может считаться удовлетворительной. Плохая воспроизводимость вызвана, как правило, либо изменениями в условиях хроматографирования, либо изменением эффективности колонки. Проблемы с воспроизводимостью, вызванные изменением эффективности

колонки, выражаются обычно изменением удерживания или ухудшением симметрии пика. В табл. 8.12. приведены возможные характерные симптомы причин плохой воспроизводимости анализов, связанных с колоночными изменениями, а также наиболее вероятные и необходимые действия по их предотвращению. Несмотря на то, что приведённая в табл. 8.12 информация относится к хроматографическим системам как изократического, так и градиентного элюирования, при градиентном элюировании есть ряд дополнительных особенностей. Стандартная колонка 250x4.6 мм имеет внутренний объём приблизительно 2.5 мл и требует, по крайней мере, 10-15 объёмов подвижной фазы для достижения состояния равновесия. Это необходимо учитывать при составлении программы градиента. Самая распространённая ошибка заключается в том, что по окончании градиентного элюирования колонку либо забывают смыть сильной фазой, либо после смывки задают недостаточное время для достижения равновесия, необходимое для начала следующего анализа, либо то и другое наблюдается одновременно. При недостаточной скорости формирования градиента отдельные компоненты пробы могут накапливаться в колонке, постепенно загрязняя её. Например, если для анализа требуется градиент подвижной фазы с начальным содержанием органического модификатора 10% и конечным - 70%, то для того, чтобы смыть с колонки все компоненты пробы этого может быть недостаточно. Необходимо создать концентрацию 75 - 100%. Если колонка сильно загрязнена, то необходимо сначала промыть её обратным током с расходом в 5 раз меньшим рабочего. Отсоедините колонку от детектора, переверните её и вымойте из неё весь буферный раствор (если таковой использовался) водой. После этого перейдите на 100% органический растворитель. Наиболее приемлемым для этих целей является ацетонитрил, так как в обращённо-фазовой хроматографии он обладает большей элюирующей способностью, чем метанол.

Таблица 50. Причины плохой воспроизводимости

Изменения условий хроматографирования	Изменения эффективности колонки
Изменение подвижной фазы: <ul style="list-style-type: none"> - рН - процент органического модификатора - концентрация буферного раствора - концентрация добавок (ион-парного реагента) - профиль градиента Изменение температуры	Колонка неуравновешенна Колонка перегружена Загрязнение колонки
Изменение скорости потока	Потеря привитой фазы

Если этого оказалось недостаточно, перейдите на пропан-2-ол, который более эффективно растворяет многие белки, пептиды и жиры и является более сильным растворителем, чем ацетонитрил или даже ТГФ. При этом помните, что вязкость пропан-2-ола значительно выше, чем ацетонитрила и метанола, поэтому расход по сравнению с рабочим должен быть снижен не менее чем в 3-4 раза.

Плохая воспроизводимость параллельных вводов пробы может быть вызвана и плохой воспроизводимостью смешения компонентов ПФ. Данная причина относится исключительно к недостаткам конструкции ВЭЖХ систем. Для ее устранения следует помнить, что в ВЭЖХ системах с формированием градиента на линии высокого давления динамические миксеры обеспечивают значительно более высокую воспроизводимость смешения, чем статические смесители потока. Особенно сильно это проявляется при смешении растворителей сильно отличающихся по вязкости. В системах градиентного элюирования с формированием

градиента на линии низкого давления воспроизводимость смещения сильно зависит от степени дегазации компонентов и правильной работы соленоидных клапанов программатора градиента и геометрии камеры смещения.

7.6. Регенерация загрязненных колонок.

Технически наиболее удобный метод разделения – изократическая ВЭЖХ. Если при этом подвижная фаза постоянного состава обладает недостаточной элюирующей силой для того, чтобы смыть сильно удерживающиеся (не анализируемые) компоненты пробы с колонки, они накапливаются на сорбенте, и эффективность колонки будет постепенно ухудшаться. Основными симптомами загрязнения колонки являются: увеличение перепада давления, изменение времён удерживания, широкие и «хвостящие» несимметричные пики, потеря разрешения.

Эффективность загрязнённой колонки может быть в большинстве случаев восстановлена путем продолжительной промывки сильным растворителем, например, 100% ацетонитрилом. Если это не помогает, то следуйте инструкциям по регенерации колонок, приведённым ниже.

Регенерация обращённо-фазовых колонок с внутренним диаметром 4.6 мм:

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку от буферных растворов и солей обратным током 25 мл воды со скоростью 0.2-0.3 мл/мин.
3. Промойте колонку 25 мл пропан-2-ола с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
4. Промойте колонку 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0.5 мл/мин.
5. Промойте колонку 25 мл гексана с расходом не более 0.5 мл/мин.

Таблица 51. Устранение плохой воспроизводимости по удерживанию

Причины плохой воспроизводимости	Симптомы	Необходимые действия
Колонка неуравновешенна	<ul style="list-style-type: none"> – Постоянное увеличение или уменьшение времён удерживания – Неправильная форма пика 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Уделяйте больше времени уравниванию колонки. Перед вводом пробы промойте колонку как минимум 15 объёмами подвижной фазы (35 мл для колонки 250 x 4.6 мм). 2) Если для анализа необходим слабый элюент, промойте колонку сначала более сильным растворителем.
Загрязнённая колонка.	<ul style="list-style-type: none"> – Продолжительное уменьшение времени удерживания – Неправильная форма пика – Увеличивающееся давление 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Промойте колонку обратным током сильным растворителем с расходом в 5 раз меньшим по сравнению с рабочим. 2) Если промывка не помогает, замените колонку. В следующий раз используйте предколонку.
Потеря привитой фазы	<ul style="list-style-type: none"> – Систематическое изменение (обычно уменьшение) времён удерживания – Неправильная форма пика 	Замените колонку, если она больше не удовлетворяет вашим запросам. Используйте специальные колонки, стабильные в широком диапазоне pH.
Перегрузка колонки	<ul style="list-style-type: none"> – Уменьшение времени удерживания при увеличении массы введённого образца 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Разбавьте пробу перед вводом. 2) Подберите колонку с большим внутренним диаметром.

6. Промойте колонку ещё раз 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0.5 мл/мин.
7. Промойте колонку ещё раз 25 мл пропан-2-ола с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
8. Подсоедините колонку в обычном направлении. Промойте колонку подвижной фазой, не содержащей буферный раствор, только после этого добавьте в подвижную фазу буферный раствор с рабочим расходом.
9. Приведите колонку в равновесие 25 – 50 мл подвижной фазы.
10. Введите пробу или стандарт, чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

Для колонок меньшего диаметра соблюдайте пропорциональное снижение расходов.

Регенерация нормально-фазовых колонок с внутренним диаметром 4.6 мм:

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку обратным током 50 мл смеси метанол – хлороформ с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
3. Промойте колонку 50 мл этилацетата с расходом 0.5 мл/мин.
4. Подсоедините колонку в обычном направлении.
5. Приведите колонку в равновесие 50 мл подвижной фазы.
6. Введите пробу или стандарт, чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

Для колонок меньшего диаметра также соблюдайте пропорциональное снижение расходов. В связи с меньшей вязкостью нормально-фазовых элюентов требования к низкому расходу растворителя менее жестко.

8. Вопросы

1. Дайте определение хроматографии.
2. Какие особенности хроматографии позволяют достичь лучшего разделения веществ с близкими свойствами по сравнению с другими методами разделения.
3. Перечислите способы получения хроматограмм. Что используется в качестве элюентов в каждом из способов?
4. Как можно осуществлять идентификацию определяемых соединений в смеси после их хроматографического разделения?
5. Что такое индексы удерживания? Какие системы индексов удерживания используют в хроматографии (преимущественно в газовой)?
6. Перечислите способы количественного анализа в хроматографии. Сравните их между собой.
7. Перечислите основные положения концепции теоретических тарелок. В чем ее недостатки?
8. Как оценивают эффективность хроматографической колонки? Как величина эффективности отражается на форме хроматографического пика?
9. Какая из теорий хроматографии дает основу для оптимизации эффективности хроматографической колонки?
10. Какие типы колонок используют в хроматографии? Сравните их между собой.
11. Как зависит высота, эквивалентная теоретической тарелке, от скорости потока подвижной фазы: а) для насадочных (набивных) колонок и капиллярных колонок в газовой хроматографии; б) для насадочных колонок в газовой и жидкостной хроматографии?
12. Как влияет форма изотермы сорбции на форму хроматографического пика?
13. Какая величина используется в хроматографии для оптимизации условий хроматографического разделения?
14. От каких факторов зависит величина разрешения?
15. Какие варианты газовой хроматографии вы знаете? Сравните их возможности, укажите область применения.
16. В чем преимущества капиллярной газовой хроматографии? Чем они определяются?
17. Сравните два режима разделения в газовой хроматографии – изотермический и программирование температуры.
18. Перечислите детекторы в газовой хроматографии.
19. На чем основано получение сигнала при использовании катарометра? Почему в этом случае теплопроводность газа-носителя должна быть как можно большей?

20. Какой газ-носитель следует выбрать при использовании катарометра: а) для определения низких концентраций метана, окиси углерода или кислорода; б) водорода?
21. На чем основано получение сигнала при использовании ионизационных детекторов? Сравните принцип работы пламенно-ионизационного детектора и детектора электронного захвата.
22. Объясните принцип работы фотоионизационного детектора в газовой хроматографии. В чем его достоинства?
23. Перечислите преимущества масс-спектрометрического детектора. Объясните принцип его работы.
24. С какой целью в газовой хроматографии используют системы с двумя последовательно соединенными детекторами? По какому принципу эти детекторы выбирают?
25. Что такое – реакционная газовая хроматография? Какие Вы знаете варианты метода? В чем преимущества и недостатки реакционной газовой хроматографии?
26. Какие аналитические задачи позволяет решать метод газовой хроматографии?
27. Можно ли определять неорганические соединения с использованием газовой хроматографии? Какие варианты метода используют для этого?
28. Перечислите особенности и преимущества высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Какие варианты метода используют в аналитической практике?
29. Какие сорбенты используют в ВЭЖХ? Каким требованиям они должны отвечать?
30. Почему наиболее популярные сорбенты в ВЭЖХ – силикагель и, особенно, модифицированные силикагели? Как проводят модификацию силикагеля?
31. Перечислите требования к подвижной фазе в ВЭЖХ.
32. Чем определяется элюирующая способность подвижной фазы в жидкостной хроматографии?
33. Как подбирают состав подвижной фазы в жидкостной хроматографии?
34. Что такое градиентный режим элюирования? Какими преимуществами он обладает по сравнению с изократическим элюированием?
35. Как влияет температура на эффективность и селективность разделения в жидкостной хроматографии?
36. Сравните два варианта адсорбционной ВЭЖХ – нормально-фазовой и обращенно-фазовой.
37. Какие модели можно использовать для описания механизма разделения веществ в нормально-фазовой хроматографии?

38. Какими закономерностями описывается удерживание веществ в обращенно-фазовой ВЭЖХ?
39. Что такое – ион-парная обращенно-фазовая ВЭЖХ? Какие неподвижные и подвижные фазы используют в данном варианте хроматографии?
40. Как повысить (понижить) элюирующую способность подвижной фазы в нормально-фазовой, обращенно-фазовой и ион-парной хроматографии?
41. Перечислите основные детекторы, которые используют в ВЭЖХ.
42. Сравните принцип работы и возможности применения спектрофотометрического и флуориметрического детекторов в ВЭЖХ.
43. Какие вещества можно определять при использовании амперометрического детектора? На чем основано получение сигнала при использовании этого детектора?
44. Дайте определение ионной хроматографии.
45. Требования к ионообменникам в ионной хроматографии. Как их синтезируют?
46. Как проводят разделение анионов (катионов) двухколоночной ионной хроматографией? В чем состоит роль подавляющей колонки (системы)?
47. Перечислите достоинства и недостатки планарной (тонкослойной) хроматографии (ТСХ).
48. Перечислите варианты элюирования компонентов в ТСХ.
49. Какие Вы знаете способы идентификации веществ в ТСХ.
50. Какие приемы используют для количественного определения компонентов в тонкослойной хроматографии?
51. Как можно повысить эффективность разделения компонентов в планарной (тонкослойной хроматографии).
52. На чем основано разделение веществ в методе капиллярного электрофореза (КЭ).
53. Какие варианты капиллярного электрофореза Вы знаете? Чем определяется время миграции веществ в КЭ?
54. В чем причина возникновения электроосмотического потока (ЭОП)? Какие факторы влияют на его направление и величину?
55. Укажите направление движения ЭОП, катионов и анионов в немодифицированном кварцевом капилляре при приложении напряжения.
56. Как можно обратить ОЭП? Для чего используют этот прием в КЭ?
57. Укажите направление движения ЭОП, катионов, анионов в модифицированном капилляре при приложении напряжения. Нарисуйте общий вид электрофореграммы.

Билеты для сдачи экзамена по спецкурсу «Хроматографические методы анализа»

Билет 1

1. Определение хроматографии. Особенности метода. Способы получения хроматограмм. Связь хроматографических параметров удерживания с коэффициентом распределения. Идентификация и количественный анализ хроматографическими методами.
2. Ионообменная хроматография. Ионообменное равновесие. Ионная хроматография. Сорбенты. Подвижные фазы.
3. Анализ различных классов органических соединений газовой хроматографией.

Билет 2

1. Классификация хроматографических методов. Поведение вещества на хроматографической колонке. Внутренняя и внешняя хроматограммы. Способы получения хроматограмм.
2. Ионообменники, их особенности и получение. Кинетика ионного обмена, ее связь с физико-химическими свойствами ионообменников разных типов. Ионообменники для высокоэффективной хроматографии, их особенности.
3. Применение различных видов хроматографии в анализе лекарственных соединений.

Билет 3

1. Общая теория хроматографического разделения. Разрешение хроматографических пиков. Связь разрешения с эффективностью и селективностью. 4σ - и 6σ -разделение.
2. Молекулярная (адсорбционная) хроматография. Нормально- и обращенно-фазовая хроматография. Роль подвижной фазы. Элюирующая сила. Закономерности удерживания.
3. Применение различных видов хроматографии в анализе неорганических соединений.

Билет 4

1. Размывание хроматографических пиков. Линейная равновесная хроматография. Основные положения концепции теоретических тарелок. Недостатки теории теоретических тарелок. Влияние формы изотермы сорбции на размывание хроматографической полосы.
2. Газовая хроматография. Варианты метода. Аппаратурное оформление метода. Колонки. Детекторы. Программирование температуры.
3. Подход к выбору хроматографического метода в зависимости от природы анализируемого объекта.

Билет 5

1. Размывание хроматографического пика. Кинетические теории хроматографии. Факторы, влияющие на размывание зон. Эффективность колонки, ее характеристики.
2. Нормально-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография. Основные представления о механизме удерживания. Сорбенты. Подвижные фазы. Аппаратурное оформление. Области применения.
3. Реакционная газовая хроматография.

Билет 6

1. Неподвижные фазы в газовой хроматографии. Их классификация. Модифицированные сорбенты. Высокоэффективная капиллярная хроматография.
2. Токослойная и бумажная хроматография. Теоретические основы методов. Величина R_f , факторы, влияющие на нее. Техника получения хроматограмм. Методы качественного и количественного анализа.
3. Анализ органических соединений методом жидкостной хроматографии.

Билет 7

1. Неподвижные фазы в жидкостной хроматографии. Требования к неподвижной фазе. Силикагель и его модифицирование. Роль подвижной фазы. Варианты жидкостной хроматографии.
2. Идентификация веществ в газовой хроматографии. Индексы удерживания. Требования к анализируемым веществам в газовой хроматографии. Реакционная газовая хроматография.
3. Использование хроматографии в анализе вод.

Билет 8

1. Кинетические теории хроматографии. Факторы, влияющие на размывание зон. Пути повышения эффективности хроматографической колонки.
2. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография. Основные представления о механизме удерживания. Сорбенты. Подвижные фазы. Аппаратурное оформление. Области применения.
3. Сравнение методов ВЭЖХ, капиллярной газовой и сверхкритической флюидной хроматографии.

Билет 9

1. Общая теория хроматографического разделения. Разрешение хроматографических пиков. Связь разрешения с эффективностью и селективностью. 4σ - и 6σ -разделение.
2. Основные принципы электросепарационных разделений. Варианты электросепарационных методов. Электроосмотический поток, факторы, влияющие на него. Электрофоретическая подвижность ионов, факторы, влияющие на нее. Преимущества электросепарационных методов.
3. Подход к выбору хроматографического метода в зависимости от природы анализируемого объекта.

Билет 10

1. Селективность и эффективность хроматографического разделения. Их связь с величиной разрешения. Оптимизация хроматографического разделения.
2. Ионная хроматография. Варианты ионной хроматографии. Средство ионов к ионообменникам. Элюенты, их состав и элюирующая способность. Аппаратурное оформление метода. Условия определения анионов и катионов.
3. Разделение органических соединений методами капиллярной газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

9. Литература

1. Количественный анализ хроматографическими методами. /Под ред. Э.Кац. – М.: Химия, 1990.
2. Сакодынский К.И., Бражников В.В., Воков С.А., Зевленский В.Ю., Ганкин Э.С., Шатц В.Д. Аналитическая хроматография. М.:Химия, 1993.
3. Основы аналитической химии. В двух книгах. /Под ред. Ю.А. Золотова. М.: Высш.шк., 2004.
4. Руководство по газовой хроматографии. В 2-х ч. Пер. с нем. /Под ред. Э.Лейбница, Х.Г.Штруппе. М.: Мир, 1988.
5. Столяров Б.В. и др. Практическая газовая и жидкостная хроматография. С.-Пт.: С.-Петербургский университет, 1998.
6. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографиию. М.: Мир, 1989.
7. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Зинатне, 1988.
8. Шпигун О.А., Золотов Ю.А. Ионная хроматография и ее применение в анализе вод. М.: Изд-во МГУ, 1980.
9. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В., Филиппов А.А., Селеменев В.Ф., Приданцев А.А. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж: Водолей, 2004.
10. Руденко Б.А., Руденко Г.И. Высокоэффективные хроматографические процессы. В 2-ух томах. М.: Наука, 2003.
11. Красиков В.Д. Основы планарной хроматографии. С.-Пт.: Химиздат, 2005.
12. Ахрем А.А., Кузнецова А.И. Тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1964.
13. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Ч. 1,2 М.: Мир, 1980.
14. Березкин В.Г., Бочков А.С. Количественная тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1970.

15. Руководство по капиллярному электрофорезу./Под ред. А.М.Волощука, Научный совет по хроматографии. М.: Наука, 1996.
16. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ» С-Пб.: ООО «Веда», 2006.
17. Хроматографический анализ окружающей среды. Пер с англ. / Под ред. В.Г. Березкина, М.: Химия, 1979.
18. Другов Ю.С., Родин А.А. Газохроматографическая идентификация загрязнений воздуха, воды и почвы. Практическое руководство. С.-Пт.: Теза, 1999.
19. Другов Ю.С., Родин А.А. Газохроматографический анализ газов. Практическое руководство. С.-Пт.: Анатолия, 2001.
20. Другов Ю.С., Родин А.А. Экологическая аналитическая химия. Учебное пособие для вузов. С.-Пт.: Анатолия, 2002.
21. Фармакопейная статья предприятия ОАО «Химико-фармацевтический комбинат «Акрихин»- Пикамилон таблетки. М.: Министерство Здравоохранения Российской Федерации, 2001.
22. Кирсанов Н.Б., Сизова И.А., Тяглов Б.В., Яненко А.С.// Биотехнология. 1995. №5-6. С.41-43.
23. Сытинский И.А. Гамма-аминомасляная кислота – медиатор торможения. Л.: Наука, 1977.
24. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С.338-339.
25. Система капиллярного электрофореза «Капель» исполнение «Капель-105» Руководство по эксплуатации. С.– Пт.: ООО «Люмэкс», 2003.
26. Руководство пользователя «МультиХром для Windows». М.: ЗАО «Амперсенд», 1993-2006.