



Высокоэффективная хроматография

Детекторы



Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

- Основное назначение детектора, применяемого в ВЭЖХ, заключается в определении наличия аналитов в подвижной фазе и дальнейшей передаче сигналов на регистрирующее устройство.
- Он должен быть устойчив к изменениям условий окружающей среды (например, температуры) и **максимально быстро реагировать на появление компонента в потоке элюента.**
- Наиболее распространенным детектором является **ультрафиолетовый**. Кроме того, применяются рефрактометрический, кондуктометрический и флуоресцентный детекторы и др.
- **Сигнал детекторов, применяемых в ВЭЖХ, пропорционален концентрации компонента (г/мл) — т. е. сигнал детектора также зависит от значения объемного потока подвижной фазы**

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

- Детекторы для ВЭЖХ должны фиксировать изменение каких-либо свойств растворителя, выходящего из колонки, связанное с наличием в нем анализируемых веществ.
- Это может быть:
 - изменение оптических свойств элюента (в ИК-, УФ- или видимой области),
 - его показателя преломления,
 - способности флюоресцировать,
 - электропроводности,
 - способности окисляться или восстанавливаться,
 - диэлектрической проницаемости и т.д.

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

- Детекторы подразделяются на селективные и универсальные.
- Селективные детекторы способны зафиксировать элюирование интересующих исследователя веществ, обладающих специфическими свойствами, на фоне многих других компонентов, такими свойствами не обладающих.
- Эти детекторы (**флюоресцентный, электрохимический** и др.) находят широкое применение в анализе следовых количеств лекарственных препаратов в биологических образцах, микропримесей, биогенных аминов

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

- **Универсальные детекторы** должны реагировать на элюирование любых веществ вне зависимости от того, обладают они какими-то особыми свойствами или нет.
- Такие детекторы находят широкое применение в органической химии, нефтехимии, фармацевтической, химической, медицинской промышленности, биологических науках

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

Какими же свойствами должен обладать идеальный детектор для ВЭЖХ?

- Он не должен вызывать размывания зоны пика, выходящего из колонки, и ее уширения.
- Должен иметь высокую чувствительность и отклик на прохождение вещества, который можно предсказать.
- Образец не должен разлагаться, проходя через детектор.
- Изменения температуры, скорости потока и состава растворителя не должны влиять на работоспособность детектора.
- Отклик детектора на количество вещества должен быть линейным, и линейный диапазон должен быть широким.
- Детектор должен быть простым и удобным в работе и обслуживании.
- Детектор при прохождении вещества должен давать не только количественную информацию, но и качественную, подтверждающую состав или строение вещества.
- Отклик детектора должен появляться при прохождении через кювету любого вещества, этот отклик не должен зависеть от растворителя, он

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

Какие же **характеристики детекторов** нужно принимать во внимание, подбирая подходящий для данной задачи детектор? Эти характеристики следует подразделять на те, которые связаны с самой конструкцией детектора, и на те, которые зависят от свойств растворителя, анализируемого вещества.

- Каждый детектор характеризуется определенным **шумом**, который для разных типов детекторов выражается в разных единицах
- Чем меньше шум у детектора по сравнению с другим такого же типа, тем лучше использованные конструкционные элементы, более удачная схема, лучше регулировка. Разница в шуме у разных детекторов одного типа может составлять порядок и даже больше (по данным фирм-производителей).
- Другая очень важная величина — это **дрейф нулевой линии**, который определяется смещением нулевой линии в процессе работы детектора за определенный отрезок времени после прогрева. Эта величина также может иметь разницу у детекторов одного типа более чем на порядок.

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

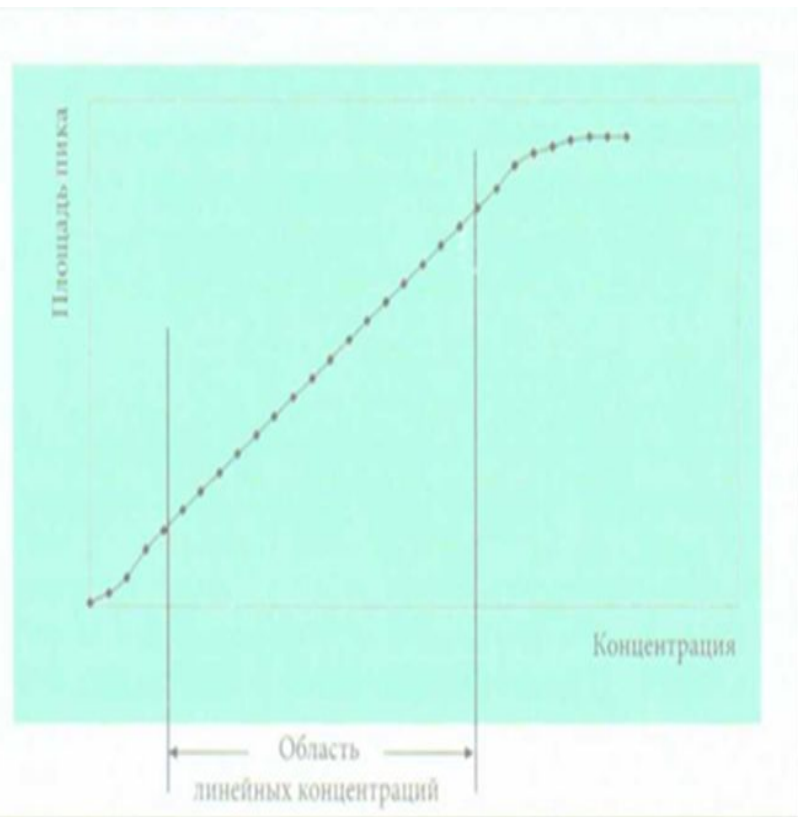
- Вместимость **кюветы детектора** является фактором, наряду с ее геометрией (размывающей или неразмывающей), определяющим, насколько могут быть размыты пики, попадающие в нее из колонки. Вместимость кюветы должна быть не более 0,1 объема первого пика, который представляет интерес для исследователя (например, если первый такой пик выходит в объеме 30 мкл, вместимость кюветы не должна превышать 3 мкл
- Наконец, если детектор работает в градиентном режиме или в условиях, не исключающих некоторого изменения окружающей температуры, очень большое значение имеет нечувствительность детектора к флуктуациям температуры, скорости потока и изменению состава растворителя и стабильность его отклика вне зависимости от изменения этих условий.

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

Тип детектора	Минимальная детектируемая концентрация, г/мл	Типичная область применения
Ультрафиолетовый	Около 10^{-10}	Анализируемые компоненты способны поглощать излучение УФ-диапазона
Рефрактометрический	Около 10^{-7}	Сахара, глицерин, гликоли, аминокислоты
Кондуктометрический	Около 10^{-7}	Соли, ионогенные вещества

- Наибольшее значение при выборе детектора для проведения ВЭЖХ-анализа имеют параметры «**минимальная детектируемая концентрация**» и «*линейная область концентраций*» (линейный диапазон). Оба параметра зависят от типа аналита и детектора.
- В таблице приведены значения минимальных детектируемых концентраций наиболее распространенных детекторов в ВЭЖХ.

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии



- Область линейных концентраций детектора (рис. 2.36) описывается интервалом концентраций, в котором сигнал (площадь пика) прямо пропорционален концентрации анализируемого компонента.
- Нижняя граница интервала линейных концентраций ограничена минимальными пределами детектирования, верхняя — лимитирована принципом работы детектора.
- Значение верхней границы интервала линейных концентраций зависит от типа проб, при этом разработчик метода должен определить, соответствует ли реальная концентрация аналита верхней границе интервала.
- Если концентрация аналита слишком высокая, то пробу следует разбавить, если слишком низкая, — необходимо предпринять соответствующие меры, чтобы сконцентрировать пробу, — например, методом твердофазной экстракции.

УФ-детекторы

Если анализируемый компонент способен поглощать УФ-излучение, можно оценить его содержание с помощью УФ-детектора.

УФ-детекторы имеют очень широкую область линейных концентраций и могут применяться при градиентном элюировании.

Они слабочувствительны к колебаниям температуры.

На рис. 2.37 представлена оптическая система УФ-детектора.

После того как подвижная фаза покидает колонку, она протекает через измерительную кювету детектора. Объем типичной измерительной кюветы составляет 4-10 мкл.

- УФ-излучение (чаще всего используют дейтериевую лампу D2) проходит одновременно через измерительную кювету и кювету сравнения, которая

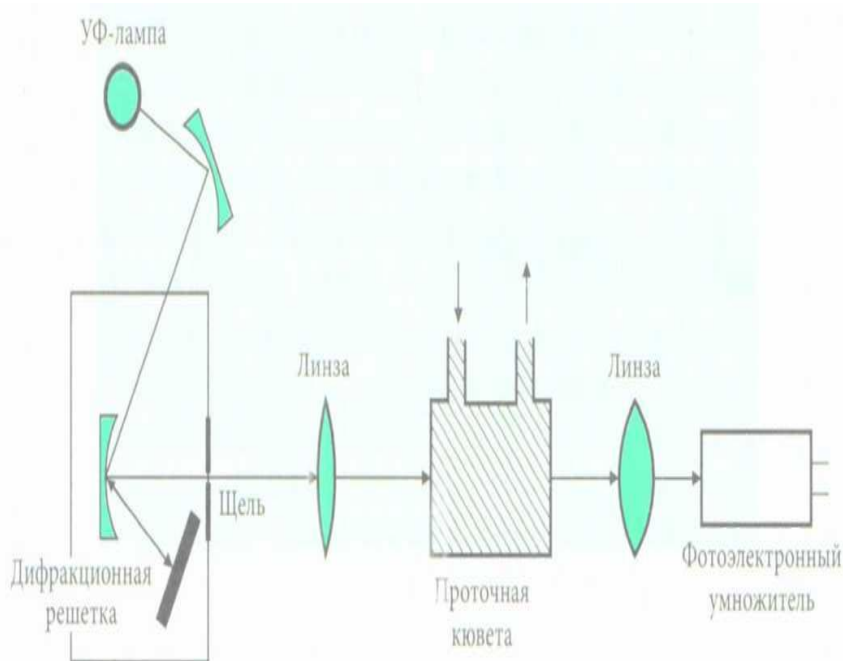


Рис. 2.37. Оптическая система УФ-детектора

УФ-детекторы



- **Дейтериевые лампы** испускают УФ-излучение с непрерывным спектром и максимумом при длине волны λ в 340 нм.
- **Вольфрамовые лампы** испускают излучение в ультрафиолетовом и видимом диапазонах с максимумами при длинах волн около 340 и 850 нм.
- Таким образом, вольфрамовые лампы являются идеальным дополнением дейтериевых.
- Продолжительность работы УФ-ламп составляет около 1000 ч.
- Во многие детекторы встраивают устройства, позволяющие проверять качество работы ламп.
- Для установки длины волны излучения, необходимой для анализа определенного соединения (вещества), источники света оснащены монохроматорами.

УФ-детекторы

Таблица 2.4
Растворители и границы их прозрачности
в УФ-диапазоне

Растворитель (элюент)	Граница пропускания λ , нм
Вода	190
Ацетонитрил	190
Гексан	200
Метанол	205
Хлороформ	240

- Перед проведением измерения для проверки правильности работы детектора необходимо пропустить чистый элюент через ячейку сравнения и измерительную ячейку.
- **При этом подвижная фаза не должна поглощать испускаемое лампой излучение в заметной степени.**
- При меньшем значении длины волны растворители начинают интенсивно поглощать УФ-излучение.
- Значение таких «границ пропускания» растворителей, применяемых в ВЭЖХ, приведены в табл. 2.4.
- **Ниже значения границы пропускания проводить измерения нельзя.**
- При необходимости элюент следует заменить.

УФ-детекторы

$$E = \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot d$$

- С помощью фотоэлектронного умножителя измеряется интенсивность УФ-излучения и рассчитывается значение светопоглощения (оптической плотности).
- В идеальном случае при протекании через детектор только подвижной фазы значение этой величины остается постоянным.
- Как только анализируемый компонент, способный поглощать УФ-излучение, попадает на детектор, значение оптической плотности (светопоглощения) резко возрастает. Зависимость оптической плотности E от концентрации вещества в пробе описывается законом Ламберта — Бера
- где E — оптическая плотность;
- $\varepsilon(\lambda)$ — молярный коэффициент экстинкции (постоянная величина для вещества) при длине волны λ , л/(моль • см);
- d — толщина слоя кюветы (толщина поглощающего слоя), см;
- c — концентрация вещества в пробе, моль/л.

УФ-детекторы

$$C = \frac{m}{M \cdot V}$$

- В идеальном случае $\varepsilon(\lambda)$ и d являются константами, поэтому оптическая плотность E пропорциональна концентрации анализируемого компонента.
- При этом концентрация c рассчитывается как частное от деления массы m растворенного вещества на молярную массу продукта M и объем элюата V (подвижная фаза после прохождения через хроматографическую колонку):

УФ-детекторы

- Поэтому при проведении анализа очень важно устанавливать постоянную скорость подачи подвижной фазы.
- **Измерения необходимо проводить при максимальном значении величины оптической плотности для данного вещества.**
- **Отдельные исследования максимальных значений оптической плотности проводятся разработчиком метода с помощью внешнего УФ-спектрофотометра.**
- **Если максимальные значения поглощения анализируемых компонентов в смеси наблюдаются при различных длинах волн, то необходимо использовать диодно-матричный детектор (ДМД).**
- Такие детекторы позволяют одновременно (!) определять значения оптической плотности при 1028 различных длинах волн в диапазоне от 180 до 400 и более нм.
- Таким образом, получают трехмерную хроматограмму, на которой, помимо времени и интенсивности сигнала, приводится значение длины волны λ .
- Такие ДМД также используются для выбора оптимальной длины волны и дают возможность пользователю идентифицировать пики с помощью

УФ-детекторы

- Чувствительность детектирования зависит от типа детектора и может варьироваться в пределах 0,005-3,0 оптических единиц (опт. ед.; англ. *absorption unit full scale, AUFS*).
- Чем *меньше* установленное значение *AUFS*, тем *выше* чувствительность детектора.
- Чтобы минимизировать ошибки измерения, количества анализируемых проб выбирают, по возможности, таким образом, чтобы детектируемые сигналы попадали в середину диапазона детектирования (и наоборот).

УФ-детекторы

- Если спектрофотометр предполагается установить и эксплуатировать в условиях атмосферы, содержащей пары органических веществ, воды, пыли (например, в производственных лабораториях), целесообразно приобрести спектрофотометр, чувствительная оптическая схема которого герметично защищена от вредного влияния загрязнений атмосферы. Этому же способствует регулярная замена осушителя, обычно силикагеля, помещаемого внутри спектрофотометра.
- Спектрофотометр по своим характеристикам приближается к универсальным и селективным детекторам (в зависимости от выбранной длины волны).
- При длинах волн, близких к 190 нм, он позволяет детектировать сахара, жиры, сложные и простые эфиры, ПАВ полиоксиэтиленгликолевого ряда и другие вещества, практически не поглощающие УФ-излучения при 210 нм и выше — здесь он приближается к универсальному детектору.

УФ-детекторы

- Существуют быстро сканирующие спектрофотометрические детекторы, которые позволяют снять УФ-спектр вещества при его прохождении через кювету без остановки потока.
- Применению спектрофотометров как универсальных детекторов, работающих при длинах волн около 200 нм, в большой мере препятствует очень малый выбор растворителей, УФ-прозрачных в этом диапазоне.
- **Только тщательно очищенные ацетонитрил и вода могут использоваться в обращенно-фазном варианте при 200 нм и ниже.**
- Получить такие высокочистые растворители очень трудно, и стоят они дорого. Еще труднее очистить для работы в этой области алканы (гексан, гептан и др.).

Рефрактометрические детекторы

- Рефрактометрические детекторы применяются в тех случаях, когда анализируемые компоненты **не поглощают** УФ-излучение, а **показатели преломления чистой подвижной фазы и аналитов имеют разное значение**.
- Можно осуществить количественное определение высокомолекулярных спиртов, таких как гликоли, углеводов или аминокислот.
- **Рефрактометрические детекторы не могут применяться при градиентном элюировании**, так как показатель преломления подвижной фазы постоянно меняется.
- Поскольку **показатель преломления растворов зависит от температуры**, необходимо обеспечить ее постоянство в кювете.
- В рефрактометре Френеля растворитель протекает через ячейку сравнения, при этом через

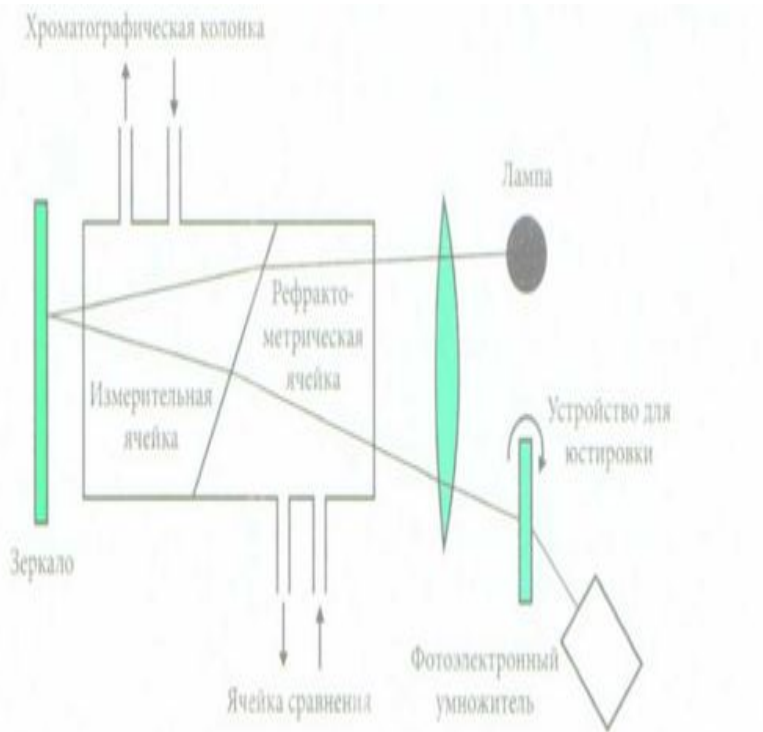


Рис. 2.38. Принцип работы рефрактометрического детектора

Рефрактометрические детекторы

- **Рефрактометр Френеля.** Действие данного детектора основано на законе Френеля, который гласит, **что количество света, отраженного от поверхности раздела двух веществ (жидкости и стекла), пропорционально разности показателей преломления этих веществ и углу падения света на поверхность раздела**

Рефрактометрические детекторы

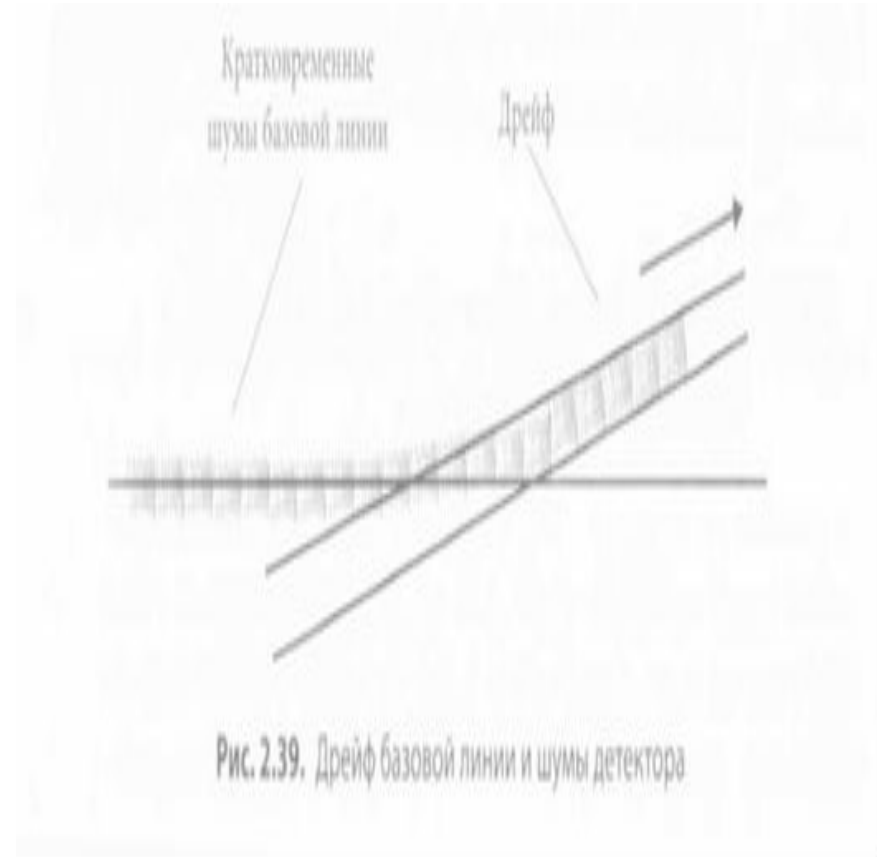
- После того как луч света покинул призму, его направляют на фотоэлемент.
- Если луч, прошедший через измерительную ячейку, больше не попадает на фотоэлемент из-за того, что изменился показатель преломления элюата, то сопротивление фотоэлемента в измерительной ячейке также изменяется.
- Разность потенциалов фоторезисторов обеих ячеек передается в форме электрического сигнала на регистрирующее устройство.
- **Наименьшая концентрация, которую можно определить с помощью рефрактометрического детектора, при наиболее благоприятных условиях составляет около 10^{-7} г/мл.**
- Чувствительность рефрактометрических детекторов в 1000 раз меньше, чем у ультрафиолетовых

Рефрактометрические детекторы

- **Главным достоинством этого детектора является универсальность**, так как при выборе подходящего растворителя он может детектировать любые вещества.
- Поэтому он **занимает второе место (после УФ-детектора) по частоте использования**.
- К другим достоинствам рефрактометра относятся **возможность работы с любыми растворителями в широком интервале скорости потока**, невысокие требования к чистоте подвижной фазы, надежность и удобство в эксплуатации.
- **Некоторые модели детекторов могут работать при температуре до 150 °С**, что является исключительно важным для эксклюзионной хроматографии ряда синтетических полимеров

Кондуктометрические детекторы

- Кондуктометрические детекторы, как правило, применяются в ионообменной хроматографии.
- После прохождения элюата через колонку измеряют его электропроводность.
- Если электропроводность элюата изменяется, то на самописец передается электрический сигнал.
- Другой проблемой, возникающей при проведении ВЭЖХ, является слишком **высокий шум детектора и постоянное отклонение базовой линии в определенном направлении (дрейф)**.
- На рис. 2.39 изображены эти два нарушения.



Кондуктометрические детекторы

Причинами появления более сильных шумов могут быть:

- краткосрочное изменение величины потока; пузырьки воздуха в кюветах детектора;
- неисправная лампа детектора (с отработанным сроком эксплуатации); колебания температуры (рефрактометрический детектор);
- неполное смешение растворителей в градиентной ВЭЖХ;
- нарушение работы электроники детектора и вычислительной системы.

Кондуктометрические детекторы

- Дрейф базовой линии может быть продиктован загрязнением хроматографической колонки.
- При протекании элюента через колонку (особенно в тех случаях, когда в качестве элюента используют достаточно «сильный» растворитель) осажденные в колонке частицы примесей медленно вымываются элюентом.
- Если при использовании УФ-детекторов применяют растворители, «граница пропускания» которых для установленных длин волн является слишком высокой, то в результате шумы детектора усилятся.

Флуориметрические детекторы

- Детектирование по флуоресценции применяют в биологии, медицине, фармакологии, при анализе пищевых продуктов и контроле загрязнения окружающей среды.
- Флуоресцентными свойствами, т.е. **способностью излучать свет (в видимой области спектра) под действием ультрафиолетового излучения**, обладают многие биологически-активные вещества: **лекарства, витамины, стероиды**.
- **Красители, соединения с сопряженными связями**, в том числе **полиядерные ароматические углеводороды**, также можно определять с помощью флуориметрического детектора, при этом чувствительность определения велика.

Флуориметрические детекторы

- Интенсивность флуоресцентного излучения зависит от интенсивности возбуждающего излучения и квантового выхода процесса возбуждения.
- Поэтому для повышения чувствительности метода следует использовать достаточно мощные источники света, например газоразрядные лампы или лазеры.
- С помощью ФМД с высокой чувствительностью можно детектировать аминокислоты, амины, витамины, стероиды.
- Высокая чувствительность является одним из главных преимуществ.

Флуориметрические детекторы

- Разработаны детекторы, которые могут одновременно работать и как спектрофотометры и как флуориметры.
- Детекторы с монохроматорами, позволяющими выбрать необходимые длины волн для возбуждающего и флуоресцентного излучения, обеспечивают высокую чувствительность и селективность, однако они оказываются значительно более дорогими, чем флуориметры с постоянной спектральной полосой.
- Флуориметр применяют при анализе **микропримесей**, когда мала концентрация растворенного вещества, подлежащего обнаружению

Флуориметрические детекторы

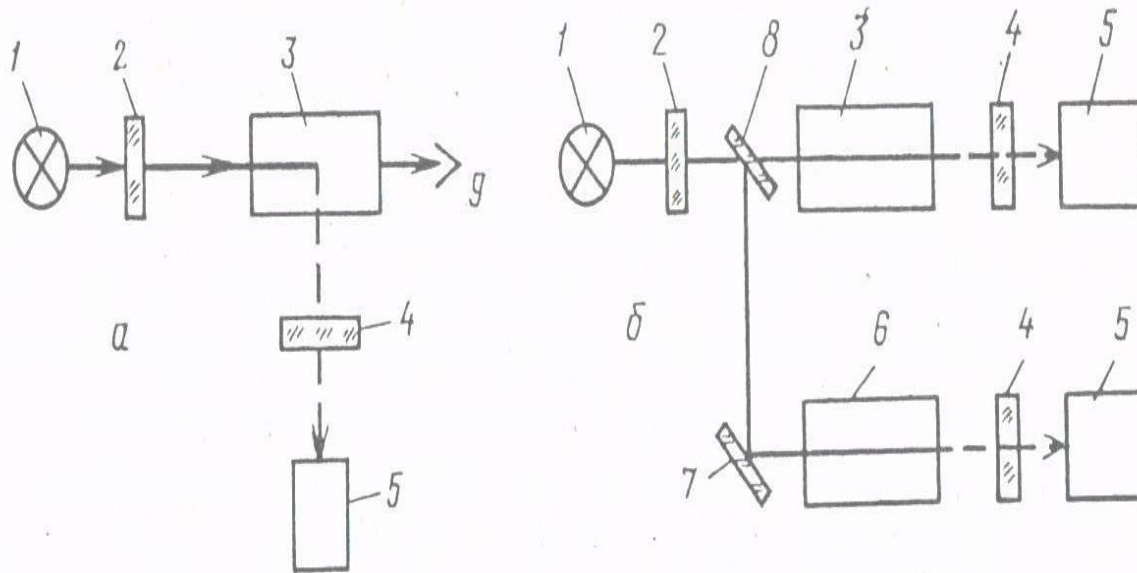


Рис. III.26. Прямоугольная (а) и линейная со сравнительной ячейкой (б) конструкции флуориметрических детекторов:

1 — источник света; 2, 4 — фильтры; 3 — проточная рабочая ячейка; 5 — фотоприемник; 6 — сравнительная ячейка; 7, 8 — полупрозрачные зеркала; 9 — ловушка света. Сплошная линия — возбуждения; пунктирная — свет эмиссии

- Для измерения обычно используют два типа конструкций ФМД.
- Свет от УФ источника проходит через фильтр 2 и фокусируется в проточной ячейке 3 с прямоугольной или линейной конструкцией ввода и вывода света эмиссии. Излучение проходит через фильтр 4 и измеряется с помощью фотоприемника 5.
- При применении ФМД подвижная фаза не должна поглощать свет на длине волны поглощения, ни на длине волны излучения

Электрохимические детекторы

- В ВЭЖХ наряду с широким применением оптических детекторов за последние 10—15 лет наметился значительный прогресс в развитии **электрохимического метода детектирования**.
- Доказательством этого является увеличение числа публикуемых работ по разработке и применению электрохимических детекторов (ЭХД) главным образом, увеличение выпуска аппаратуры, пригодной для практического использования
- Благодаря высокой чувствительности и селективности, ЭХД особенно эффективен для анализа некоторых важных для биохимии и медицины соединений, таких как **эстрогены и катехоламины**, присутствующие обычно в малых концентрациях в тканях крови и других сложных объектах исследования.
- ЭХД применяют также для анализа веществ при исследовании загрязнений окружающей среды ввиду его высокой чувствительности и селективности к **фенолам, бензидинам, нитросоединениям, ароматическим аминам и пестицидам**.

Электрохимические детекторы

Наибольшее применение ЭХД нашел в обращенно-фазовой и ионообменной ВЭЖХ, в которой используют полярные элюенты.

- В нормально-фазовой ВЭЖХ также можно применять ЭХД, если после разделительной колонки в неполярную подвижную фазу добавить электролит или подходящий растворитель с высокой диэлектрической проницаемостью.
- **Работа электрохимических детекторов основана на определении электрохимических свойств соединений в потоке элюента.**

Электрохимический детектор. Этот детектор можно применять для анализа всех веществ, обладающих электрохимической активностью, т. е. способными при определенном потенциале окисляться или восстанавливаться, соответственно отдавая или принимая электроны.

Вольтамперометрический детектор

- **Вольтамперометрический детектор (ВАД)** применяют для анализа широкого круга **неорганических и органических веществ**. Большинство неорганических ионов могут быть электрохимически окислены или восстановлены.
- Среди органических соединений электроактивными являются **соединения с кратными связями, окисляемыми или восстанавливаемыми функциональными группами, ароматические и другие соединения**.
- **Поскольку для каждого класса электроактивных соединений характерен определенный потенциал окисления или восстановления, этот потенциал и определяет селективность детектора.**
- На практике метод окисления осуществить проще, так как из элюента и из пробы не надо удалять растворенный кислород. **В детекторе имеется по крайней мере два электрода — рабочий и сравнительный, по отношению к которому устанавливается потенциал рабочего электрода.**
- **В качестве сравнительного чаще всего используют каломельный или хлорсеребряный электроды.** В некоторых детекторах дополнительно устанавливают вспомогательный электрод, необходимый для

Вольтамперометрический детектор

- Вольтамперометрические, полярографические и некоторые типы кулонометрических детекторов измеряют ток как функцию времени при постоянном напряжении на электродах.
- В качестве материалов электродов используют ртуть, платину, золото, серебро, графит, угольную пасту и др.

Вольтамперометрический детектор

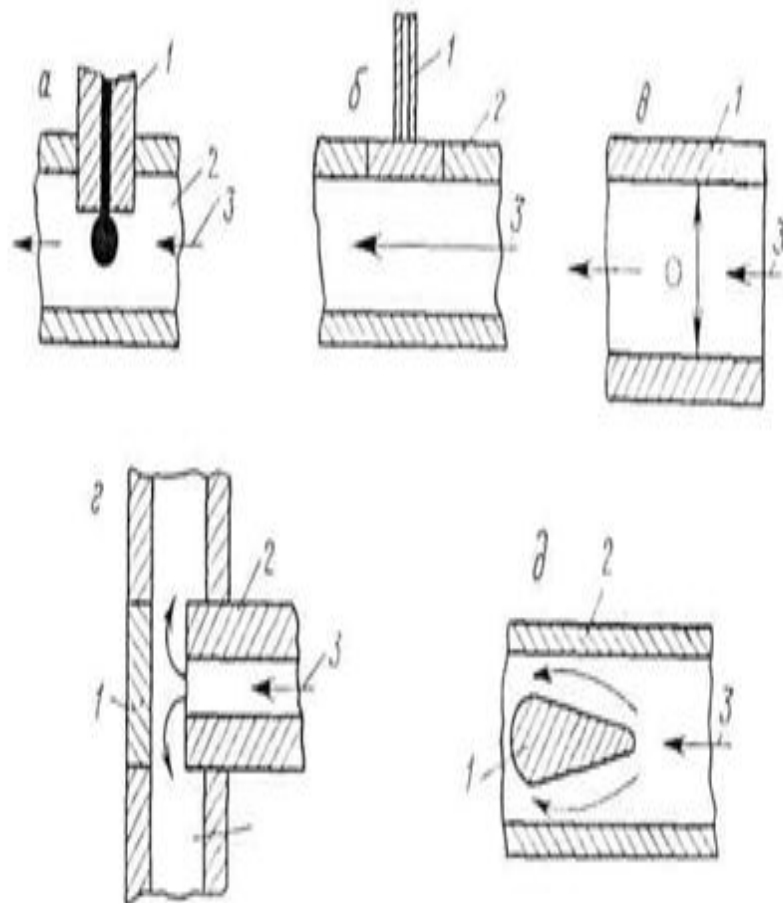


Рис. III.27. Некоторые типы рабочих электродов электрохимического детектора:
 а — сферический, б — плоский, в — цилиндрический, г — типа «стенка — сопло», д — конический;
 1 — рабочий электрод, 2 — ячейка, 3 — поток элюента

- **Сигнал ВАД измеряется как ток при постоянном потенциале на электродах** и зависит от гидродинамических условий работы рабочего электрода.
- Большинство обычных твердых электродов имеет плоскую тонкослойную гидродинамическую систему или систему «стенка — сопло», с которыми легче получить рабочий объем ячейки менее 1 мкл.
- Электроды в тонкослойной ячейке располагают часто в промежуточном канале параллельно потоку.
- Некоторые типы рабочих электродов ЭХД представлены на слайде.

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

Кроме детекторов, описанных выше, для ВЭЖХ используют и другие приборы: электрохимический,

- инфракрасный,
- детектор с диодной матрицей,
- масс-спектрометрический,
- радиоактивный,
- по диэлектрической проницаемости,
- электронозахватный,
- кулонометрический и др.

Одни из них обладают высокой селективностью или чувствительностью, другие дают важную качественную информацию.

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

- Кроме детекторов, описанных выше, для ВЭЖХ используют и другие приборы: электрохимический,
- инфракрасный,
- детектор с диодной матрицей,
- масс-спектрометрический,
- транспортный с пламенно-ионизационным детектированием,
- радиоактивный,
- по диэлектрической проницаемости,
- электронозахватный,
- кулонометрический и др.

Одни из них обладают высокой селективностью или чувствительностью, другие дают важную качественную информацию.

Детекторы, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии

ИК-детекторы. Детекторы, основанные на поглощении в инфракрасной области спектра, в ВЭЖХ применяют сравнительно недавно и в достаточной степени ограничено. Главной причиной такого положения является несовместимость ИК-детектора с основными растворителями, применяемыми в адсорбционной и обращенно-фазной хроматографии, а также сравнительно невысокая чувствительность.

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

Правильный выбор подвижной фазы зависит:

- во-первых, от энергии адсорбционных взаимодействий разделяемых компонентов с неподвижной фазой,
- а во-вторых — от элюирующей силы растворителя.

Чем выше энергия адсорбционных взаимодействий, тем больше должна быть элюирующая сила подвижной фазы.

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

Для начала следует определить, какой тип хроматографии (ОФ- или НФВЭЖХ) должен быть использован в каждом конкретном случае.

- **Общепризнано, что применяемые растворители должны смешиваться друг с другом.**
- **При НФВЭЖХ** в качестве подвижной фазы применяют ***неполярные растворители***.

К таким растворителям относятся (растворители расположены в порядке возрастания элюирующей силы):

- n -пентан;
- n -гексан;
- циклогексан;
- дихлорметан (метиленхлорид);
- этиловый эфир уксусной кислоты.

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

- В НФ ВЭЖХ можно изменять элюирующую силу подвижной фазы в определенных пределах с помощью смешивания «более слабого» растворителя, например n-гексана (при применении которого анализируемый компонент плохо отделяется от неподвижной фазы), с «более сильным», например дихлорметаном.
- Сложно добиться установления равновесия между силикагелем и элюентом, поэтому следует избегать больших скачков в элюотропном ряду при выборе элюента.
- Использование градиентного элюирования в НФ ВЭЖХ рационально только в редких случаях.
- Лучше всего применять для каждого растворителя отдельную колонку.

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

- В **ОФВЭЖХ** используют **полярные органические растворители**, которые содержат определенное количество воды.
- Так как вода не может смачивать поверхность неполярной неподвижной фазы, она выполняет функцию «тормоза», т. е. **с увеличением содержания воды повышается время удерживания анализируемых компонентов в хроматографической системе.**
- Органические компоненты, применяемые в ОФВЭЖХ, называют *модификаторами*
- Растворитель должен содержать не более 90% воды, в противном случае «щетки», т. е. длинные привитые к поверхности неподвижной фазы, могут разрушаться

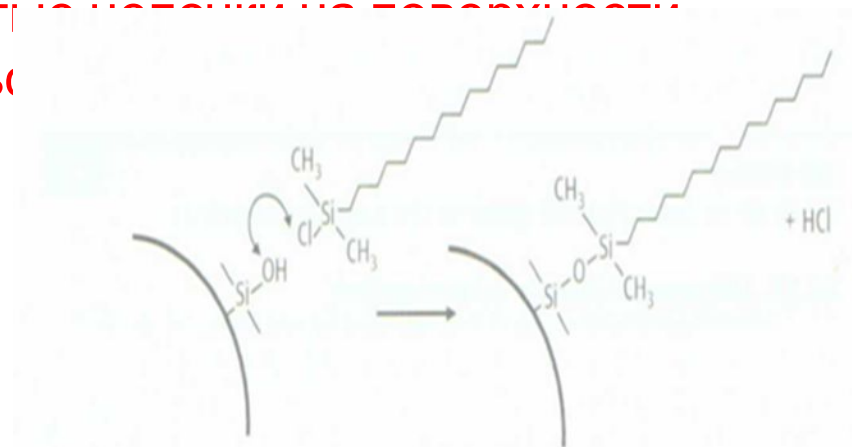


Рис. 2.35. Преобразование силикагеля при его взаимодействии с силилирующими реагентами

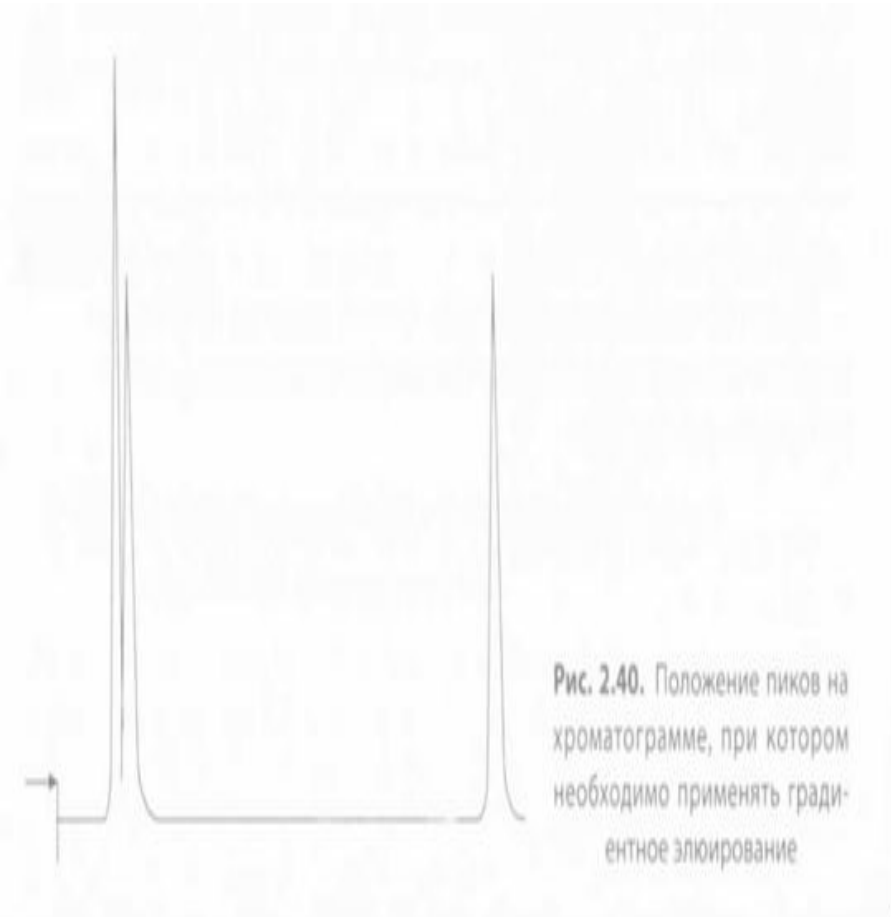
Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

- Кроме того, вода, применяемая в ВЭЖХ, должна быть очень чистой.
- При необходимости (особенно для градиентной ВЭЖХ) такой степени очистки можно добиться применением специальных устройств (вода, профильтрованная через фильтр *Millipor* с диаметром пор около 0.45 мкм).
- **Недостаточно просто осуществить обессоливание воды!**
- После введения модификатора в воду необходимо очень тщательно проводить **дегазацию элюента**.
- Начинать процесс хроматографического разделения лучше с элюентом, содержащим 70-80% метанола и 30-20% воды (концентрации принято указывать в объемных процентах).
- При изократическом элюировании растворители отдельно смешивают в определенных количествах и проводят дегазацию пробы.
- **При применении градиентного элюирования процессом смешивания растворителей можно управлять с помощью специальных программ.**

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

- Наибольшую опасность при использовании водных элюентов представляет **загрязнение растворов микроорганизмами**, в особенности в тех случаях, когда применяют **старые реактивы или буферные растворы**.
- Поэтому работы следует проводить в максимально стерильных условиях.
- При необходимости употребляют специальные дезинфицирующие средства, которые, однако, не должны детектироваться и появляться на хроматограмме.
- Многие пользователи в таких целях используют очень разбавленный раствор **азиды натрия**. Впрочем, у последнего есть существенный минус: **очень высокая токсичность**, поэтому при работе с этим веществом нужно строго соблюдать правила техники безопасности.

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ



- После проведения хроматографического разделения в первую очередь обращают внимание на то, где именно появился пик на хроматограмме.
- Если некоторые пики располагаются в начале хроматограммы ($k' < 1$) и при этом они не полностью разделены, а еще один пик находится на слишком удаленном от них расстоянии ($k' > 5$), то обязательно следует проводить градиентное элюирование (рис. 2.40).
- Если для всех пиков значение $k' < 2$, необходимо увеличить содержание воды в элюенте.

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

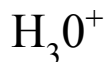
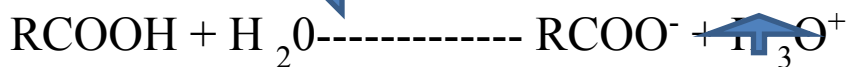
- Если для всех пиков значение $k' > 5$, то содержание метанола в элюенте необходимо увеличить. Содержание воды в составе элюента при этом следует рассчитывать таким образом, чтобы большинство пиков на хроматограмме соответствовало значениям коэффициента емкости должны составлять от $k' = 1$ до $k' = 7$. Элюирующая сила подвижной фазы тогда будет оптимальной.
Если все пики разделены до базовой линии и нет их расширения, то состав подвижной фазы также можно считать оптимальным
- При наличии не до конца разделенных пиков необходимо далее подбирать состав подвижной фазы для повышения ее селективности.
- Для этого заменяют **модификатор**.
- В большинстве случаев **вместо метанола используют ацетонитрил (CH_3CN)**.
- Для того чтобы элюирующая сила растворителя также была соответствующей, количество нового вводимого модификатора согласно эмпирическому правилу должно составлять 10-15% от ранее установленного содержания метанола.

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

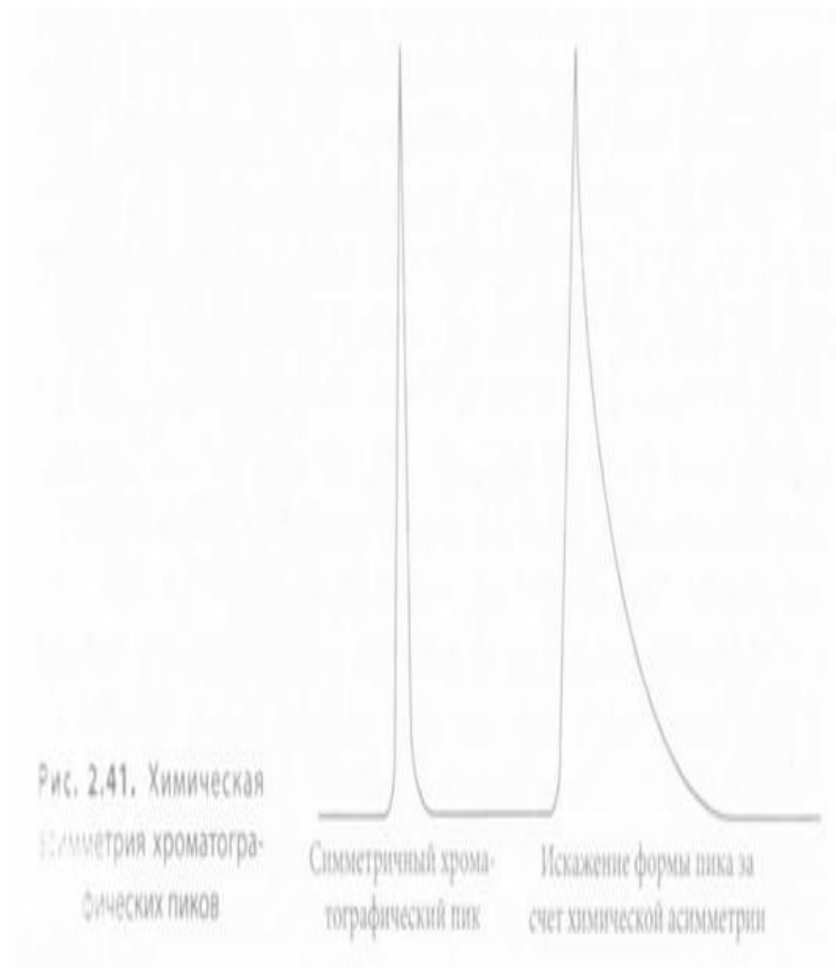
- Если, например, оптимальная элюирующая сила подвижной фазы устанавливается при содержании 85% метанола и 15% воды, то сначала в качестве элюента используют смесь, содержащую 75% ацетонитрила и 25% воды. При той же элюирующей силе (со значениями пиков между $k'=2$ и $k'=7$) такая смесь растворителей обладает существенно лучшей селективностью элюента и, как правило, вполне достаточна для разделения пиков на хроматограмме.
- Если полного разделения всё же не происходит, можно попытаться разделить компоненты методом градиентного элюирования.
- Следует учитывать, что ацетонитрил является очень токсичным и требует строгого соблюдения правил техники безопасности.

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

- Особый случай представляет разделение полярных и ионогенных анализов методом ОФВЭЖХ, при котором использование смеси модификатора и воды может давать очень широкие пики на полученной хроматограмме (явление «химической асимметрии», рис. 2.41).
- В таких случаях необходимо применять буферные растворы для создания необходимого значения pH, которое препятствует диссоциации анализов.
- В недиссоциированном состоянии разделение ионогенного анализа не представляет каких-либо трудностей.
- Например, при добавлении кислого буфера равновесие протолитической реакции органической кислоты смещается в сторону недиссоциированной кислоты



Добавление кислоты



Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

- Буферные растворы для ОФВЭЖХ изготавливают из цитратов, фосфатов, тартратов и аминов.
- В зависимости от степени протолиза α аналита концентрация солевых компонентов буфера c должна составлять приблизительно 10-50 ммоль/л.
- Однако следует учитывать, что применение буферов сокращает продолжительность эксплуатации колонки. **Значение pH в ОФВЭЖХ ни в коем случае не должно быть менее 2 или более 10.** При необходимости в исключительных случаях в качестве неподвижной фазы используют специальные материалы.
- **Важно помнить и о возможном смещении границы пропускания при применении буферной соли.** Для удаления последней перед дальнейшим использованием хроматографа необходимо промыть колонку и насос теплой

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

- При разделениях методом ионообменной хроматографии силу растворителя меняют, увеличивая или уменьшая концентрацию буферного раствора или меняя pH, в некоторых случаях используют модификацию органическими веществами.
- Однако, особенно в случае сложных природных и биологических смесей, зачастую не удастся подобрать силу растворителя таким образом, чтобы все компоненты пробы элюировались за приемлемый срок.
- Тогда приходится прибегать к градиентному элюированию, т.е. использовать растворитель, элюирующая сила которого в процессе анализа изменяется так, что она постоянно увеличивается по заранее заданной программе.
- Таким приемом удастся добиться элюирования всех компонентов сложных смесей за относительно короткий промежуток времени и их разделения на компоненты в виде узких пиков.

Выбор подвижной фазы в ВЭЖХ

- Роль подвижной фазы (растворителя) в жидкостной хроматографии весьма многообразна.
- Наряду с чисто транспортной функцией растворитель активно участвует в самом процессе разделения и оказывает существенное влияние на возможности детектирования.
- Часто незначительное изменение состава подвижной фазы дает возможность оптимизировать процесс, улучшить форму пиков, разрешение отдельных компонентов и даже изменить механизм разделения.
- Поэтому при выборе растворителей необходимо учитывать весь комплекс их свойств, в той или иной степени влияющих на проведение хроматографического эксперимента

ПОДВИЖНАЯ ФАЗА ДЛЯ ВЭЖХ

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАСТВОРИТЕЛЯМ

Растворители, применяемые в ВЭЖХ, должны удовлетворять следующим основным требованиям:

- - чистота,
- -химическая инертность,
- -совместимость с детектором,
- -достаточная растворяющая способность по отношению к анализируемым веществам,
- -низкая вязкость,
- -безопасность,
- -доступность.

В некоторых случаях существенное значение имеют смешиваемость с другими растворителями, температура кипения и возможность легкого извлечения вещества из элюата.

ПОДВИЖНАЯ ФАЗА ДЛЯ ВЭЖХ

Наличие примесей в растворителе может вызвать следующие типичные затруднения.

- **1. Ухудшение эффективности разделения и воспроизводимости результатов** (пример — неконтролируемая влажность растворителя в адсорбционной хроматографии).
- **2. Сильное отклонение нулевой линии и образование ложных пиков при градиентном элюировании.**
- **3. Ухудшение возможностей детектирования** (примеры—примеси олефинов в парафиновых углеводородах при УФ-детектировании, примесь этанола в хлороформе при ИК-детектировании).

ПОДВИЖНАЯ ФАЗА ДЛЯ ВЭЖХ

- **4.Порча сорбента:** **примеси оснований** приводят к растворению силикагеля; **примеси диенов** и других лабильных соединений осмоляются и блокируют поверхность адсорбентов, особенно оксида алюминия; **примеси карбонильных соединений** реагируют с привитыми сорбентами, содержащими аминогруппу; **пероксиды** окисляют привитые фазы и полистирольные гели.
- **5.Загрязнение веществ**, выделяемых из элюата.
- В препаративной хроматографии приходится выделять вещества из очень разбавленных растворов. При этом даже незначительные примеси или добавки, которые не мешают аналитическому разделению, могут концентрироваться в извлекаемом веществе, существенно снижая его чистоту.
- **6.Разложение или химическое изменение компонентов пробы** (типичные примеры—**гидролиз многих металлоорганических соединений**, **окисление лабильных веществ пероксидами или растворенным кислородом**)

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАСТВОРИТЕЛЯМ

- **Химическая инертность.** Все, что сказано выше о химически активных примесях, имеет гораздо большее значение применительно к химической активности самих растворителей. Дополнительно можно отметить, что такие классы соединений, как **кетоны, алифатические и ароматические амины**, следует применять с особой осторожностью и только в тех случаях, когда их трудно заменить более стабильными растворителями.
- Такие элюенты, как **хлорорганические соединения, тетрагидрофуран и другие простые эфиры**, следует использовать только свежеочищенными.

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАСТВОРИТЕЛЯМ

- **Совместимость с детектором.** Наиболее распространенными детекторами в настоящее время являются УФ-детекторы и дифференциальные рефрактометры.
- Возможность использования тех или иных растворителей в сочетании с УФ-детектором принято определять минимальной длиной волны, на которой при оптическом пути 10 мм падение интенсивности светового потока составляет 90%.
- С УФ-детектором практически не могут быть использованы такие растворители, как **бензол, толуол, тетрахлорид углерода, диметилформамид и хлороформ, а также сложные эфиры и кетоны.**
- С рефрактометрическим детектором в принципе можно применять любые растворители, но **его чувствительность определяется разностью показателей преломления растворителя и анализируемого вещества.** Поэтому при

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАСТВОРИТЕЛЯМ

- **Вязкость растворителя** должна быть по возможности низкой, так как ее повышение ведет к ухудшению массопередачи, а тем самым и эффективности разделения, а также затрудняет работу насосов. При прочих равных условиях следует выбирать растворители, имеющие вязкость 0,5—0,7 мПа при температуре разделения.
- **Безопасность работы** с теми или иными растворителями определяется их воспламеняемостью и токсичностью. Практически все растворители, применяемые в ВЭЖХ, либо имеют весьма низкую температуру вспышки, либо в определенной степени токсичны.
- Поэтому помещение, в котором проводят работы по жидкостной хроматографии, должно иметь эффективную приточно-вытяжную вентиляцию.
- На рабочем месте недопустимы плохо продуваемые и застойные зоны, так как в них могут накапливаться пары растворителей, имеющие большую плотность чем воздух.
- Нижний предел взрываемости многих растворителей составляет 1—2%, поэтому в застойных зонах возможно образование взрывоопасной смеси.

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАСТВОРИТЕЛЯМ

- Во всех случаях следует выбирать наименее пожароопасные и токсичные растворители, руководствуясь соответствующими данными. Так, диэтиловый эфир можно заменить диизопропиловым, а бензол — толуолом практически без ущерба для разделения.
- С нашей точки зрения, токсичность является более важным фактором, чем пожароопасность. При хорошей организации рабочего места и тщательном соблюдении правил техники безопасности опасность загорания практически исключена, а контакта с растворителем полностью избежать невозможно.
- Многие ароматические и хлорсодержащие растворители обладают способностью накапливаться в организме человека. По последним данным, некоторые из них, считавшиеся ранее малотоксичными (хлороформ, тетрахлорэтилен) являются канцерогенами, поэтому работа с этими растворителями требует осторожности.
- Следует отметить, что ПДК необходимо рассматривать с учетом температуры кипения растворителя: хотя метиленхлорид и хлорбензол имеют одинаковую ПДК (50 мг/м³), но при прочих равных условиях в случае

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАСТВОРИТЕЛЯМ

- **Температура кипения** — менее существенный фактор, чем характеристики, рассмотренные выше. Ее следует учитывать в основном в двух аспектах: **в надежности работы насосов и детекторов и легкости выделения вещества из элюата.**
- Низкокипящие растворители часто образуют пузырьки в насосах и детекторах.
- При использовании наиболее распространенных в настоящее время плунжерных насосов **вероятность образования пузырьков тем больше, чем выше давление паров растворителя и скорость плунжера в фазе всасывания.**
- **Наличие пузырьков в насосе резко снижает точность подачи растворителя, а пузырьки в детекторе вызывают сильный шум и нестабильность нулевой линии.**
- Для предотвращения этого явления проще всего применять растворители, температура кипения которых по крайней мере на 20—50 °С выше комнатной.
- С другой стороны, при необходимости препаративного

ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К РАСТВОРИТЕЛЯМ

- Смешиваемость с другими растворителями необходимо учитывать при работе в режиме градиентного элюирования и при подготовке анализируемого образца с использованием предварительного экстракционного разделения. Следует помнить, что подвижная фаза в ВЭЖХ всегда должна быть гомогенной. Однако такие важные полярные растворители, как метанол и ацетонитрил, ограниченно смешиваются с гексаном. Для расширения диапазона концентраций, соответствующих гомогенным смесям, гексан заменяют на циклогексан или изооктан. Полная смешиваемость в подобных системах достигается заменой полярного компонента на этанол или изопропанол.