



М И Р Х И М И И

Х. ХЕНКЕ

Жидкостная хроматография

Перевод с немецкого Н.Е. Киреевой
под редакцией А.А. Демина

ТЕХНОСФЕРА

Москва

2009

Хенке Х.

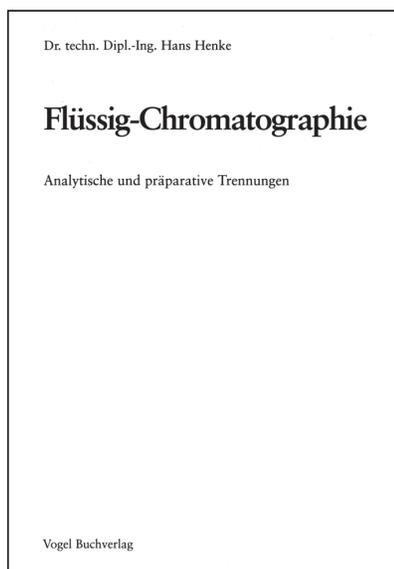
Жидкостная хроматография

Москва:

Техносфера, 2009. – 264 с., ISBN 978-5-94836-198-7

Автор приводит описание методов жидкостной хроматографии, разработанных на основе собственного многолетнего опыта. В книге рассмотрены следующие темы: аналитическое и препаративное разделение; хроматографические разделительные системы; практические примеры разделения; препаративное разделение комплексных смесей веществ; анализ следовых количеств; анализика полимера; правила анализа. Наиболее важная информация подтверждается конкретными примерами.

Книга представляет собой отличное справочное пособие для специалистов по очистке и выделению различных веществ в лабораториях препаративной органической химии.



© 1999, Vogel Industrie Medien GmbH & Co KG, Würzburg (Germany).

All Rights reserved

© 2008, ЗАО «РИЦ «Техносфера», перевод на русский язык,
оригинал-макет, оформление

ISBN 978-5-94836-198-7

ISBN (нем.) 3-8023-1757-2

Содержание

Предисловие	7
Введение	8
Классификация хроматографии	9
Теоретические принципы хроматографических процессов разделения	12
Удерживающая способность	12
Теоретические основы эксклюзионной хроматографии	15
Объемные отношения в гелевом наполнителе	16
Параметры элюирования в хроматографии исключения	17
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЕ РАЗДЕЛЕНИЯ	21
1.1. Приборы (устройства)	21
1.1.1. Насосы	22
1.1.2. Градиентные системы	22
1.1.3. Дозатор для проб	22
1.2. Колонки	22
1.3. Наполнители колонки	23
1.3.1. Силикагели и структурированные органические полимеры	23
1.4. Подвижные фазы	24
1.5. Детекторы	24
1.6. Устройства для сбора и обработки данных	24
ГЛАВА 2. ПРЕПАРАТИВНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ	25
2.1. Приборы	26
2.1.1. Насосы	26
2.1.2. Подготовка проб	26
2.1.3. Дозировка проб	27
2.2. Колонки	27
2.3. Материалы для заполнения колонки	27
2.3.1. Силикагели	28
2.3.2. Структурированные органические полимеры	28
2.4. Подвижные фазы	28
2.5. Детекторы	29
2.6. Коллектор фракций	29
2.7. Приборы по регистрации и обработке данных	30
ГЛАВА 3. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ РАЗДЕЛИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ	31
3.1. Выбор подходящей системы разделения	31
3.1.1. Растворимость в растворителях	33
3.1.2. Аналитические разделения	35
3.1.3. Препаративные разделения	35
3.2. Тонкослойная хроматография (ТХ) в качестве пилотного метода	36
3.2.1. Перенос с ТХ на силикагеле на колонку с силикагелем	37

3.2.2. Перенос с ТХ на колоночную хроматографию с помощью Сефадекса LH-20	39
3.3. ВЭЖХ в качестве пилотного метода	39
3.3.1. Перенос с аналитической ВЭЖХ на препаративную ВЭЖХ	40
3.3.2. Перенос аналитической ВЭЖХ на колоночную хроматографию (КХ) низкого давления	43
ГЛАВА 4. ПРИМЕРЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ИЗ ПРАКТИКИ	52
4.1. Продукты реакции	52
4.1.1. Синтез <i>n</i> -фенилендиизоцианата	52
4.1.2. Производные <i>m</i> - и <i>n</i> -фенилендиизоцианата	55
4.1.3. Метанолизат моноглицерида	57
4.1.4. Эмульгатор для прядильной препарации	59
4.1.5. Водорастворимое производное лигнина	62
4.1.6. Реакционный продукт из масляной (бутановой) кислоты, глицерида и акриловой кислоты	63
4.1.7. Смесь триметилпропанакрилата	65
4.1.8. Сложный эфир кислоты жирного ряда 3-диметиламино-1,2-пропандиола	66
4.1.9. Продукт переэтерификации – изолирование сложного метилового эфира рицинолевой кислоты	70
4.2. Эмульгаторы	71
4.2.1. Полиглицоль спирта	72
4.2.2. Сложный эфир полиглицоля кислоты жирного ряда	82
4.2.3. Этоксильированный метиловый эфир полидиметилсилоксана и полиглицоль спирта жирного ряда	91
4.2.4. Эмульгатор и соэмульгатор	92
4.2.5. Этоксильированный сложный сорбитановый эфир	95
4.2.6. Сополимеры этилена и пропиленоксида	97
4.2.7. Полиэтиленгликоли	99
4.3. Сложный эфир сорбитановой кислоты жирного ряда	106
4.3.1. Сорбитанмонолаурат	107
4.3.2. Сорбитановый моноолеат	108
4.3.3. Сорбитантриолеат	108
4.4. Сложный эфир фосфорной кислоты	109
4.4.1. Смеси сложных эфиров фосфорной кислоты	109
4.5. Масла сложных эфиров	112
4.5.1. Смесь сложных тетраэфиров пентаэритрита	113
4.5.2. Сложный эфир триметилпропана	116
4.5.3. Смесь масел сложного эфира	118
4.6. Жидкостно-хроматографическое разделение лекарственного сырья	118
4.7. Сефадекс LH-20 в сравнении с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) и гель-проникающей хроматографией (ГПХ)	123

ГЛАВА 5. ПРЕПАРАТИВНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ СЛОЖНЫХ СМЕСЕЙ ВЕЩЕСТВ	126
5.1. Прядильные препараты	126
5.2. Свойства современных прядильных препаратов	126
5.3. Состав прядильных препаратов	127
5.3.1. «Внутренняя» и «внешняя» смазка (главный компонент)	127
5.3.2. Эмульгаторы (главный компонент)	127
5.3.3. Антистатики (главный компонент)	127
5.3.4. Средство для компактности (собранны) нити (главный компонент)	127
5.3.5. Смачивающее средство (вспомогательный компонент)	128
5.3.6. Бактерициды (вспомогательный компонент)	128
5.3.7. Средства защиты от коррозии (вспомогательный компонент)	128
5.4. Колоночно-жидкостный хроматографический анализ готовых препаратов, компонентов и экстрактов волокон	128
5.4.1. Препаративное предварительное разделение по возрастающей полярности	129
5.4.2. Гексан в качестве элюата	129
5.4.3. Дихлорметан в качестве элюата	129
5.4.4. Элюат метанола	138
5.4.5. Разделение масел сложных эфиров и эмульгаторов	154
5.5. Экстракция полиэфирных и полиамидных волокон	156
5.5.1. Экстракция с помощью петролейного эфира и метанола	157
5.5.2. Экстракция этанолом	157
5.5.3. Разделение различных смесей	157
5.6. Результаты анализов экстрактов волокон (полиэфирные и полиамидные волокна)	165
5.7. Прядильные препараты для синтетического нитяного материала	166
ГЛАВА 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ – СЛЕДОВЫЙ АНАЛИЗ	168
6.1. Количественное определение свободных мономерных диизоцианатов в экстрактах полиуретана	168
6.2. Дифениловый эфир в деполимеризатах полигликолевой кислоты	169
6.2.1. Деполимеризация – обогащение – количественная оценка	169
6.3. Количественное определение изопропанола в растительных маслах	171
6.4. Количественное определение фенола в воде	172
6.5. Количественное определение N-метилпирролидона в воде	172
ГЛАВА 7. АНАЛИТИКА ПОЛИМЕРОВ	173
7.1. Полиуретаны	173
7.1.1. Анализ полиуретанов	174
7.2. Сложный полиэфир	179
7.2.1. Анализ сложных полиэфиров	180
7.3. Поликарбонаты	181
7.3.1. Анализ поликарбонатов	181

ГЛАВА 8. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ПРЕПАРАТИВНЫЕ РАЗДЕЛЕНИЯ	185
8.1. Аналитическая ВЭЖХ	185
8.1.1. Шшиватели для полиуретанов	186
8.1.2. С ₄ -дикарбоновые кислоты	187
8.1.3. Дилаураты полиэтиленгликоля-200 (ПЭГ-200)	188
8.1.4. Мальто- и целлодекстрины	189
8.2. Препаративные разделения на готовых стеклянных колонках	189
8.2.1. Технический моностеарат глицерина	189
8.2.2. Метанолизат сложных эфиров полигликоля кислоты кокосового масла	191
8.2.3. Технический саркозид олеиновой кислоты	192
8.2.4. Экстракт полиэфирных волокон	193
8.2.5. Экстракт полиамидных волокон	194
8.2.6. Реакционная смесь (1977)	195
8.3. Препаративная гелевая хроматография	196
8.3.1. Разделение алифатических гидрокси- и дикарбоновых кислот (1976)	196
8.3.2. Алифатические кислоты (1974)	196
8.3.3. Экстракт этилацетата	198
8.3.4. Полярные компоненты прядильной препарации	199
8.3.5. Продукт реакции	199
8.3.6. Метанолизат ко-эмульгатора	200
8.3.7. Сложный эфир кислоты жирного ряда полиэтиленоксидсорбитана	202
8.3.8. Пробы	202
8.3.9. Смесь тиокарбамида – роданида аммония (1971)	206
8.3.10. Полиамид-2,2-деполимеризат (1971)	207
8.3.11. Триэтиленгликоль и 2-этилгексанол	208
8.3.12. Разделение аддуктов додецилфенол – ЭО	209
8.3.13. Мальтодекстрины	210
ГЛАВА 9. ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗОВ	212
9.1. Переэтерификация	212
9.1.1. Принцип	212
9.1.2. Проведение	213
9.2. Дериватизация через этерификацию	214
9.2.1. Получение раствора простого эфира диазометана	214
9.3. Катионит	215
9.3.1. Проведение	215
9.4. Определение общего количества этиленоксида	216
9.4.1. Принцип химико-аналитического метода	216
Сокращения и символы	219
Литература	220
Список фирм	224
Приложение	225

Предисловие

Выбранные в данной книге примеры разделения показывают, что используемые схемы разделения не были приспособлены к определенным смесям веществ, но применимы для самых различных смесей (т. е. небольшим количеством разделительных систем можно решить многие проблемы разделения). Многочисленные примеры разделения из практики доказывают широкую применяемость аналитических и препаративных систем разделения, и прежде всего связи между отдельными способами или механизмами разделения, которые иначе можно было бы объяснить только в теоретической форме. Здесь дается описание исключительно разделений с названиями компонентов проб и соответствующими химическими структурными формулами. То, что аналитик зачастую не может назвать разделенные субстанции по патентно-правовым причинам, широко известно. Однако существуют многочисленные смеси веществ или реакционные смеси, которые не попадают под эту категорию или с помощью тестовых веществ достигается аналогичная или близкая по свойствам смесь.

Самым существенным в описании разделения является объяснение, почему определенная система разделения лучше всего подходит для процесса. Из этого понятно, что проблемы разделения могут быть решены тем скорее, чем больше опыта у пользователя хроматографией.

Тема, исходя из многолетней практики и опыта, была так разработана для всех, кому приходится очищать или изолировать вещества в органическо-препаративной лаборатории, чтобы кажущиеся трудными проблемы разделения решать проще и быстрее. В фармацевтическом исследовании и промышленном производстве это касается природных или синтетических веществ: фармацевтические вещества, сырье для лаков, эмульгаторы, антистатики и полимерные добавки, а также вспомогательные вещества, такие как аддукты этиленоксида и сложные эфиры жирных кислот одно- и многоатомных спиртов.

Вся важная информация передается с помощью отобранных примеров разделения. Поэтому книга превосходно подходит в качестве справочника.

Я особенно благодарен моему многолетнему сотруднику Клаусу Рюльке за отличное сотрудничество.

Эленбах-на-Майне

Доктор Ханс Хенке

Введение

Хроматография, жидкостная или газовая, сегодня используется в аналитике в высших специальных учебных заведениях, промышленных исследованиях и в производственных методах в промышленности. Хроматографическая разделительная технология жидкостной или газовой хроматографии имеет смысл для разделения различных смесей веществ лишь в том случае, когда «классические» способы разделения, такие как, например, дистилляция, экстракция или кристаллизация, не приводят к желаемому успеху. В этой книге, возникшей из практики, будут показаны разделения исключительно с помощью жидкостной хроматографии. При этом вариант низкого давления играет доминирующую роль, однако нет недостатка и в аналитических методах — наоборот, будет показано, какую помощь оказывают быстрые аналитические разделения, будь то пилотный метод для препаративных разделений или прямой, а также косвенный метод для определения малых количеств субстанции в различных смесях веществ (оценка следовых количеств). Препаративные методы имеют большое преимущество в том, что они одновременно предоставляют возможность с помощью гравиметрии точно определить количество как известных, так и еще неопознанных компонентов смеси веществ. Предпосылкой для этого является то, что отдельные пики представляют чистые составляющие пробной смеси. В основном речь идет о разделениях, при которых определяется количество или опознаются главные компоненты, или интерес представляют все составляющие реакционной смеси или экстракта.

При этом ясно, что необязательно проводить анализы современными методами, чтобы достичь успеха, зачастую имеет смысл так их комбинировать, чтобы при новых методах отказаться от многочисленной периферии, т. е. многих компьютеров.

При препаративных разделениях очень эффективны как можно более простые и, тем не менее, очень успешные системы разделения. Наиболее удачными они являются, когда, например, в качестве подвижной фазы используется чистый растворитель. Многие примеры показывают, что такие простые разделительные системы зачастую являются достаточными. Кроме того, здесь делается ссылка на то, что аналитические методы в виде тонкослойной хроматографии (ТХ) или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при преодолении проблем разделения определенно окажут хорошую услугу в будущем. Наряду с преобладающим препаративным разделением с помощью хроматографии на колонке в области низкого давления будут также показаны разделения с помощью ТХ и ВЭЖХ.

Аналитические разделения, будь то ТХ или ВЭЖХ, которые здесь описаны, служили в основном для анализа смеси веществ или использовались как пилотный метод для препаративных разделений. С помощью аналитических методов можно быстро получить оптимальные условия разделения, чтобы можно было применять для препаративных разделений нужную систему разделения, состоящую из наполнителя колонки и подвижной фазы.

Будут представлены многочисленные разделения различных продуктов реакции, эмульгаторов, сорбитановых сложных эфиров, сложных эфиров жирных

кислот, одно- и многоатомных спиртов и прядильных препаратов. Последние являются смесями веществ, которые используются в качестве вспомогательного средства при изготовлении различных волокон из полимеров и чаще всего являются полностью природными, что касается полярности и тем самым растворимости отдельных компонентов. В дальнейшем будут показаны методы следового анализа, как в ходе прямого определения, так и комбинированные. Нет недостатка и в полимерной аналитике. И даже если с помощью современных спектроскопических приборов достигаются хорошие результаты, то разделение с помощью жидкостной хроматографии подходит лучше и для качественного, и для количественного показания. Поликомпоненты могут быть представлены в исходной форме или как стабильные производные в деполимеризате.

В главе 8 будут представлены различные аналитические разделения с помощью ВЭЖХ, а также разные препаративные разделения. Из наилучших побуждений исключены подробные тексты, так как в многочисленных случаях хроматограммы с достаточными надписями говорят сами за себя. Немногочисленными, однако часто используемыми на практике методами анализов, а также инструкциями заканчивается тема.

Классификация хроматографии

Под хроматографией вообще понимается разделение веществ, базирующееся на физико-химических методах в системе, которая состоит из неподвижной и подвижной фазы. Так, хроматографическая система разделения соединяет два несмешиваемых друг с другом компонента. Хроматография (основное понятие), один из важнейших методов разделения в исследовании и производстве, основывается на двух технологиях разделения: газовой и жидкостной хроматографии. Это значит, что техника исполнения называется по подвижной фазе, будь то газ или жидкость. В аналитическом варианте с помощью газовой хроматографии разделяются и определяются количественно (согласно статистике около 20% всех соединений) пробы, испаряющиеся без разложения, кипящие при невысокой температуре или легко улетучивающиеся после количественной дериватизации. Вещества, кипящие при высокой температуре, не испаряющиеся, а также чувствительные к температуре (около 80% природных, а также синтетических соединений), разделяются и определяются количественно как в аналитическом, так и в препаративном масштабе с помощью одного из различных жидкостно-хроматографических методов. Препаративная газовая хроматография напротив применяется еще редко, так как по сравнению с препаративной жидкостной хроматографией ее объем проб очень маленький, имея в виду истинное препаративное количество. Вместо этого большое преимущество имеет аналитическая газовая хроматография, главным образом в варианте капиллярной газовой хроматографии, так как ее намного легче связать со спектроскопическими методами (ИК – инфракрасная спектроскопия и МС – масс-спектрометрия).

На рис. Е.1 можно видеть все хроматографические технологии и способы разделения, а также механизмы разделения. Совокупность хроматографического разделения объединена в две зависимые от подвижной фазы технологии разделения.

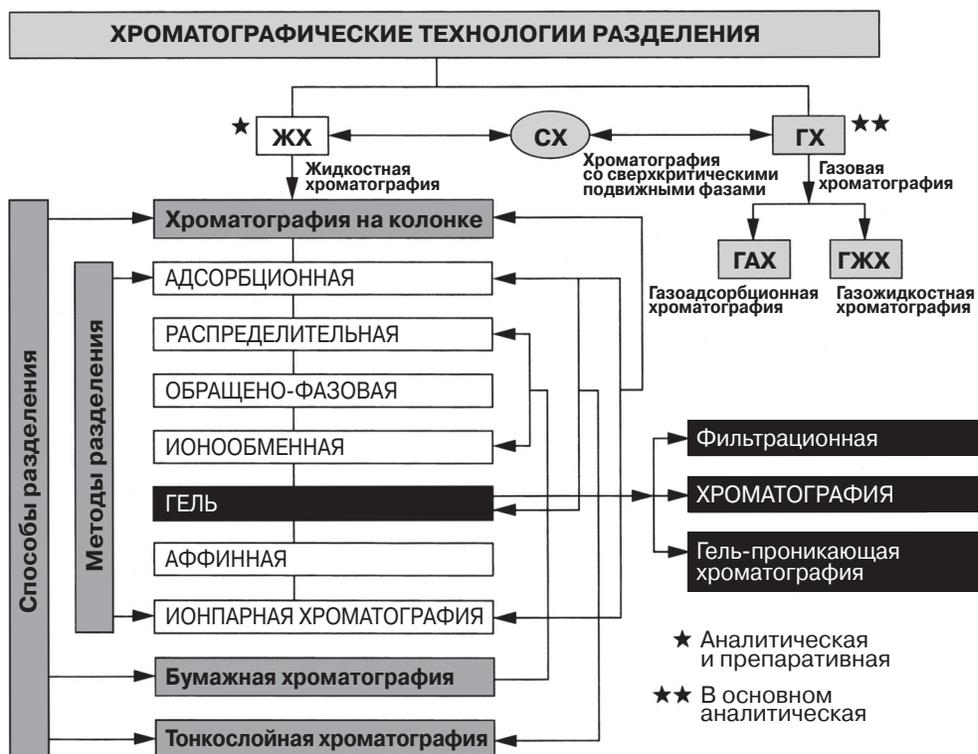


Рис. Е.1

Если подвижная фаза – жидкость, то речь идет о жидкостной хроматографии (ЖХ) (англ. Liquid Chromatography, сокращенно LC), в отличие от газовой хроматографии (ГХ), при которой подвижная фаза – это инертный газ и выполняет исключительно роль транспортного средства.

Хроматография со сверхкритическими подвижными фазами (сверхкритическая флюидная хроматография, сокращенно СХ) может быть расположена между ЖХ и ГХ, так как она родственна обеим технологиям разделения. Для СХ при этом упорядочении следует также оставаться в пределах хроматографических технологий. Подробную информацию можно получить в соответствующих монографиях, которые здесь конкретно не названы.

Подразделение на газовую, как и на жидкостную, хроматографию осуществляется на основе комбинирования обеих фаз (ГЖХ = газожидкостная и ГАЗХ = = газоадсорбционная хроматография) и обозначает, что неподвижная фаза является жидкостью или твердым телом; таким образом, речь идет о распределительной или адсорбционной хроматографии. Это подразделение, как видно на рис. Е.1, можно также найти в ЖХ, с той лишь разницей, что эта технология после исполнения претерпевает последующую классификацию. В основном ЖХ состоит из бумажной и тонкослойной хроматографии в различных вариантах. Электрофорез не является настоящим хроматографическим разделительным методом.

В большей степени нас интересует в связи с препаративной гель-хроматографией на Сефадексе LH-20 общая и специальная колоночно-жидкостная хроматография. Как следует из рис. Е.1, ЖХ по исполнению подразделяется на два различных способа или метода разделения: на бумажную хроматографию и хроматографию на колонке.

Первый состоит из ТХ и бумажной хроматографии (БХ). Из этих двух методов с введением ВТХ (высокоэффективной тонкослойной хроматографии) ТХ претерпела возрождение, по сравнению с «классической» ЖХ на колонке, которая познала свое второе рождение, а также обновление в форме ВЭЖХ. БХ была вытеснена ускоренной, и после стандартизации ТХ стала значительно лучшей в производстве и в течение ряда лет в форме ВТХ является аналитическим стандартным методом с многочисленными, не названными здесь, преимуществами по сравнению с ВЭЖХ.

Далее следует более детально остановиться на отдельных механизмах разделения внутри обоих способов или методов разделения жидкостной хроматографии (БХ и колоночной хроматографии).

В БХ применяются три разных механизма разделения: распределительная, фазовая и ионообменная хроматография. На рис. Е.1 три механизма разделения объединены рамкой с помощью обеих стрелок. Более варьируемой в механизме разделения является ТСХ, так как к трем названным в БХ присоединяются еще адсорбционные и гель-хроматографические разделения на тонкослойной пластинке, хотя последние в течение ряда лет проводятся в более скромном объеме.

В этой связи не следует, однако, забывать об электрофорезе в качестве разделительного и определительного методов.

Все известные механизмы разделения ЖХ могут проводиться только на колонке (будь то ЖХ низкого, среднего или высокого давления). На колонке можно, следовательно, осуществлять адсорбционную, распределительную, обращенно-фазную, ионообменную, гель-, аффинную и ион-парную хроматографию.

Законченности ради надо здесь упомянуть еще следующие хроматографические методы разделения, которые можно назвать более молодыми членами в семье хроматографии.

- Капельная противоточная хроматография (КПХ).
- Распределительно-противоточная хроматография вращения (РХ) (*ротационная*).
- Центробежная противоточная хроматография (ЦПХ).
- Кольцевая (циркулярная) хроматография.
- Экстракционная хроматография.
- Хроматография среднего давления.

Они используются в основном при разделении и изоляции природных веществ в препаративных количествах.

Если рассматривать схематическую классификацию хроматографии на рис. Е.1, то можно заметить, что под колоночной хроматографией отсутствует одна графа: хроматография на сорбентах с химически привитыми группами, таких как: аминогруппы, диольные, нитрильные и нитрогруппы. Точная классификация меха-

низма разделения не всегда возможна, так как на химически связанных фазах можно точно так же проводить разделения, как они практикуются в плане обычной хроматографии или с обращено-фазовой хроматографии на силикагеле или обращенной фазе.

В основном применяются эти четыре химически соединенные фазы для разделения определенных химических классов материалов. Так, аминофаза в течение ряда лет применяется для разделения и количественной оценки сахарных смесей. Диолфаза среди прочего хорошо подходит для разделения стероидов, органических кислот и биополимеров. На нитрильной фазе хорошо разделяются вещества с двойными связями, и, наконец, нитрофаза используется как наполнитель для колонки при разделении различных полициклических ароматических веществ и гетероциклов.

Теоретические принципы хроматографических процессов разделения

Как уже отмечалось, хроматография – это процесс разделения смеси веществ на отдельные компоненты с помощью системы, состоящей из двух не смешиваемых друг с другом фаз. Далее будут обсуждаться процессы разделения исключительно ЖХ с использованием колоночной технологии. Хроматографические разделения в основном, не говоря о специальных хроматографических механизмах разделения, таких как обращено-фазная хроматография, ионообменная, гель-хроматография, ион-парнораспределительная и биоаффинная хроматография, можно описать с помощью двух физико-химических процессов адсорбции и распределения.

Подробнее адсорбционные и распределительно-хроматографические процессы разделения, как и специальные технологии разделения, обсуждаются в соответствующих монографиях [3].

Хроматографический процесс разделения будет описан и определен на хроматограмме в основном с помощью хроматографических параметров. Под хроматограммой в колоночно-жидкостной хроматографии подразумевается элюентный профиль смеси веществ в форме пика на бумаге самописца. Форма пика есть не что иное, как изменение концентрации элюированного вещества в зависимости от времени. Для описания или характеристики отдельных пиков и всей хроматограммы могут привлекаться параметры, названные в следующем разделе.

Удерживающая способность

Она содержит время удерживания (t_R), объем удерживания (V_R), коэффициент емкости (k') и относительное удерживание (α), названное также коэффициентом разделения. С помощью этих параметров, как уже упоминалось, проводится описание пиков в хроматограмме.

Для этого применяют следующее схематическое представление: время запаздывания t_0 – это то время, которое требуется незапаздывающему веществу, чтобы пройти разделительную колонку, т. е. это время, которое для этого также требуется подвижной фазе. Если, напротив, соединение запаздывает при прохождении разделительной системы, то оно появится после времени запаздывания t_0 , т. е. оно

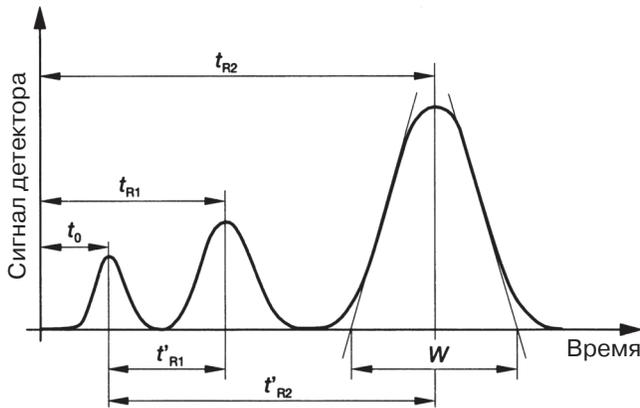


Рис. Е.2

указывает время удержания t_R . Это отставание или запаздывание основывается на том, что соединения наряду со временем удерживания в подвижной фазе вступают во взаимодействие с неподвижной фазой. Если два вещества неподвижной фазы запаздывают по-разному, то происходит их элюирование со смещением времени (t_{R1} и t_{R2}), и это приводит к разделению, как можно видеть на рис. Е.2. Время удержания нетто неподвижной фазой t'_R получают из $t_R - t_0$.

Чтобы можно было также сравнить друг с другом разделения на колонках различных размеров при различных скоростях потока, время удерживания превращается в безразмерную величину, в коэффициент емкости k' , следующим образом:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} = \frac{t'_R}{t_0}.$$

k' — это соотношение времени удерживания вещества в неподвижной и подвижной фазе. Уравнение означает, что коэффициент емкости k' — это время удерживания в неподвижной фазе в пересчете на время запаздывания. Предпочитает ли вещество оставаться в подвижной или неподвижной фазе, можно описать с помощью коэффициентов распределения K :

$$K = \frac{\text{концентрация в неподвижной фазе}}{\text{концентрация в подвижной фазе}}.$$

Величину k' можно определить следующим образом:

$$k' = K \frac{\text{объем неподвижной фазы}}{\text{объем подвижной фазы}}.$$

Следовательно, возникает логический вывод, что два вещества могут отделиться друг от друга только тогда, когда обнаруживается разность коэффициентов.

Критерием этого является относительное удерживание (α):

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}.$$

Разделение возможно только тогда, когда $k'_2 > k'_1$. Относительное удерживание является как раз при препаративных разделениях важнейшим критерием для характеристики хроматографической разделительной системы, т. е. для ее избирательности!

Высота пика h и площадь пика F пропорциональны концентрации веществ и тем самым служат для количественной оценки с помощью интегратора или системы обработки данных. Количественно можно определить отдельные пики и с помощью ручной обработки данных хотя и несколько медленно, но довольно точно. Для этого ширина пика в половинной высоте ($1/2 Br$) умножается на высоту пика h :

$$F = 1/2 Br \cdot h.$$

Перед рассмотрением упомянутого хроматографического разделения R нужно еще объяснить два важных понятия. Число тарелок или ступеней разделения N является непосредственным критерием для производительности колонны, для определенного вещества при определенных условиях. Число тарелок N пропорционально длине колонки L , и его расчет осуществляется по следующему уравнению:

$$N = \frac{L}{H} \cdot 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2,$$

где L — длина колонки, H — высота тарелки, t_R — время удерживания, W — базовая ширина пика.

Высота тарелки H колонки — это отрезок пути, который должно пройти вещество в колонне, чтобы установилось равновесие. Установление равновесия обозначает равенство между адсорбцией и десорбцией вещества. Чем короче отрезок пути для этого процесса, тем меньше высота тарелки H . При постоянной длине колонки L увеличивается количество тарелок N с уменьшением высоты тарелки H .

Высоту тарелки H можно определить из хроматограммы или на основе пика следующим образом:

$$H = \frac{L}{16} \cdot \left(\frac{W}{t_R} \right)^2.$$

Степень разделения R двух пиков определяется через удаленность их друг от друга (t_R — разница) и средним арифметическим из базовой ширины W :

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}.$$

При некоторых хроматографических разделениях стараются достичь достаточной и небольшой степени разделения. При $R = 1,5$ получается разделение почти по основной линии. Большая степень разделения только бы удлинила время анализа.

Из ранее обговоренных параметрических значений следует вывести важнейшее уравнение хроматографии:

$$R = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{k'}{1 + k'}.$$

Уравнение содержит важнейшие параметры, которые благодаря оптимизации ведут к улучшению степени разделения R . Чем проще можно повысить избирательность, т. е. относительное удерживание α , тем эффективнее система разделения.

Теоретические основы эксклюзионной хроматографии

Если осуществляется разделение веществ на пористых гелях в результате ситового эффекта, т. е. по степени уменьшения размеров молекул, то механизм разделения прост и обозрим. Все соединения, которые имеют одинаковую или большую молярную массу, чем указанный изготовителем предел исключения геля, выходят неразделенными в качестве первого пика в элюате, так как они проходят только объем между гранулами, недействительный для хроматографического процесса разделения. Предпосылкой, разумеется, является то, что вещества не задерживаются гелем. Меньшие соединения покидают колонку в соответствии с размером молекул по мере уменьшения. Они также не могут препятствовать своему элюированию, не будучи адсорбированы гелем. Элюированием мельчайших молекул (объем элюирования = объем между гранулами плюс объем пор: $V_z + V_p$) заканчивается «гель-хроматографический» процесс разделения.

Разделение смеси веществ по уменьшающемуся размеру молекул имеет много названий. Речь идет о гель-хроматографии, эксклюзионной хроматографии, молекулярно ситовой хроматографии, гель-проникающей хроматографии, диффузии полого пространства и гель-фильтрации.

Несмотря на определенные различия, имеется в виду всегда один и тот же механизм разделения, краткое описание которого можно выразить в следующих предложениях.

- Гель-хроматографией называется колоночно-хроматографический способ разделения, при котором вещества разделяются по их молекулярному размеру.
- Гель-хроматография принципиально отличается от всех других методов хроматографии. Здесь способствует разделению не какое-то взаимодействие, а простой процесс сортировки по размеру молекул.
- Гель-хроматография, а также гель-проникающая хроматография — это хроматографический метод, который применяется прежде всего в биохимии и химии природных веществ и который разделяет смесь веществ по разнице размеров.
- При гель-хроматографии компоненты смеси сортируются исключительно по размеру молекул.
- Механизм разделения при гель-хроматографии — это чисто физический механизм и основывается на сортировке по размерам молекул.
- Гель-хроматография — это особый вид жидкостно/жидкостной хроматографии для разделения веществ на базе их различных размеров молекул.

Эти описания в основном соответствуют тогда, когда разделяют высокомолекулярные вещества, т. е. полимеры на наполнителе колонки с соответствующим размером пор. Если, напротив, используются гели с низким пределом исключения, которые тоже обнаруживают сравнительно узкий пористый спектр, то и низ-

комолекулярные соединения с молярными массами (1000) также хорошо могут разделяться не только по убывающему размеру молекул, но и благодаря избирательным адсорбционным эффектам.

Если колонку в качестве суспензии заполняют пористым гелем, способным выдерживать высокое давление или набухающим для хроматографии при низком давлении, то слой геля состоит из трех фаз: растворителя (при набухающих гелях растворитель одновременно является также жидкостью для набухания) между гранулами геля и в порах, а также матрицей геля в форме неорганического и органического материала. Общий объем гелевого слоя V_t складывается в соответствии с этим следующим образом:

$$V_t = V_z + V_p + V_m,$$

где V_z – объем между гранулами, V_p – объем пор, V_m – объем матрицы геля

Объемные составляющие гелевого наполнителя лучше всего можно продемонстрировать на хроматограмме элюирования.

Объемные отношения в гелевом наполнителе

Чтобы разделить все соединения от мельчайших молекул до высокомолекулярных полимеров по снижающейся молярной массе, нужно иметь несколько гелей с возрастающим пределом исключения, которые своим пористым спектром перекрывают весь диапазон молярных масс. В зависимости от размера и спектра пор каждый гель наряду с пределом исключения имеет приблизительный диапазон разделения и фракционирования. Подробную информацию относительно отдельных гелей можно получить из специальной литературы и фирменных изданий.

Чтобы можно было охарактеризовать гель-хроматограмму, требуются объемы элюирования в качестве параметра элюирования.

- Объем между гранулами V_z – это объем жидкости между гранулами (зернами) геля набивки колонки. Гель может быть не набухающим, предназначенным для высоких давлений, или набухающим, выдерживающим лишь незначительное давление. Объем между гранулами V_z определяют с помощью высокомолекулярного вещества, которое не может проникнуть даже в самые большие поры геля. На рис. Е.3 пик 1 наглядно представляет объем между гранулами V_z и одновременно маркирует первый пик с наибольшей молярной массой. Как уже говорилось, разные изготовители предлагают многочисленные сорта гелей, будь то декстрановые, полиакриламидные или стирогели, с разными диапазонами фракционирования. Вследствие этого у них пониженный или повышенный предел исключения. V_z можно также определить исходя из размеров колонок, что составляет при статистической упаковке и приблизительно шарообразных частичках геля около $0,37 V_t$
- Объем пор V_p – это объем жидкости во всем объеме пор. Этот объем определяется с помощью веществ, которые в состоянии попасть во все, даже мельчайшие поры геля, при условии что они не будут удерживаться матрицей геля, как последний пик разделения. На рис. Е.3 пик маркирует мель-

чайшие молекулы с самым продолжительным временем элюирования, и это обозначает максимальный общий объем элюирования. Все соединения, которые меньше пика 1 или больше пика 6, появляются в соответствии с уменьшением молярных масс между крайними пиками в хроматограмме элюирования. Итак, V_p – это объем, в котором происходит разделение. Вследствие этого пик 6 испытывает полное, а пики 2–5 только частичное проникновение. Пики 7 и 8 задерживаются за счет адсорбции. То, что определение объема пор V_p не составляет проблемы, будет обсуждаться позже.

- Объем гелевой матрицы, V_m , называемый также объемом матрицы, это объем чистой гелевой матрицы и представляет собой ту часть объема колонки, которая не доступна как для растворителя, так и для пробы.

Параметры элюирования в хроматографии исключения

В хроматографии исключения характер элюирования веществ определяется с помощью значений K_d и K_{av} :

$$K_d = \frac{V_e - V_z}{V_p}, \quad K_{av} = \frac{V_e - V_z}{V_t - V_z}.$$

V_e – это объем элюирования вещества, которое претерпевает частичное проникновение и поэтому появляется после V_z , однако раньше, чем самые маленькие соединения. V_e может рассчитываться следующим образом:

$$V_e = V_z + K_d \cdot V_p,$$

при этом под K_d подразумевают долю внутреннего объема гранул, доступную для молекул данного размера. Как правило, измеряют объем элюирования и рассчитывают значения K_d при условии, что V_z и V_p известны.

Определить точные значения K_d проблематично, так как они связаны с ненадежностью в определении V_p . Значительно точнее можно определить значения K_{av} (av – англ.: available, нем.: zugänglich, рус.: доступно), так как вместо объема пор V_p для расчета используется общий объем гелевой фазы. На практике, если даже представлены многочисленные интересные разделения, нет в наличии ни значений K_d , ни значений K_{av} для характеристики результатов разделения. Практикам остается довольствоваться временем или характером элюирования, так как разделения проводятся в препаративном, а не в аналитическом масштабе.

На рис. Е.3 можно увидеть, что по объему элюирования малейших молекул на пике 6 ($V_z + V_p$ или $K_d = 1$) разделение еще не закончено. Все вещества, которые появляются позднее, будут в большей или меньшей степени сильно запаздывать, но внутри объема пор V_p также можно очень часто наблюдать разделения по увеличивающейся молярной массе.

Насколько хорошо отделились друг от друга два компонента одной пробы с помощью хроматографических методов, можно хорошо определить в эксклюзивной хроматографии с помощью понятия степени разделения R . В эксклюзивной хроматографии время удерживания не адаптируется к механизму разделения, а применяются объемы жидкости, такие как V_z , V_p и V_e , для характеристики режи-

Объем и параметры элюирования

в гелевой хроматографии на Сефадексе LH-20 (Sephadex LH-20)

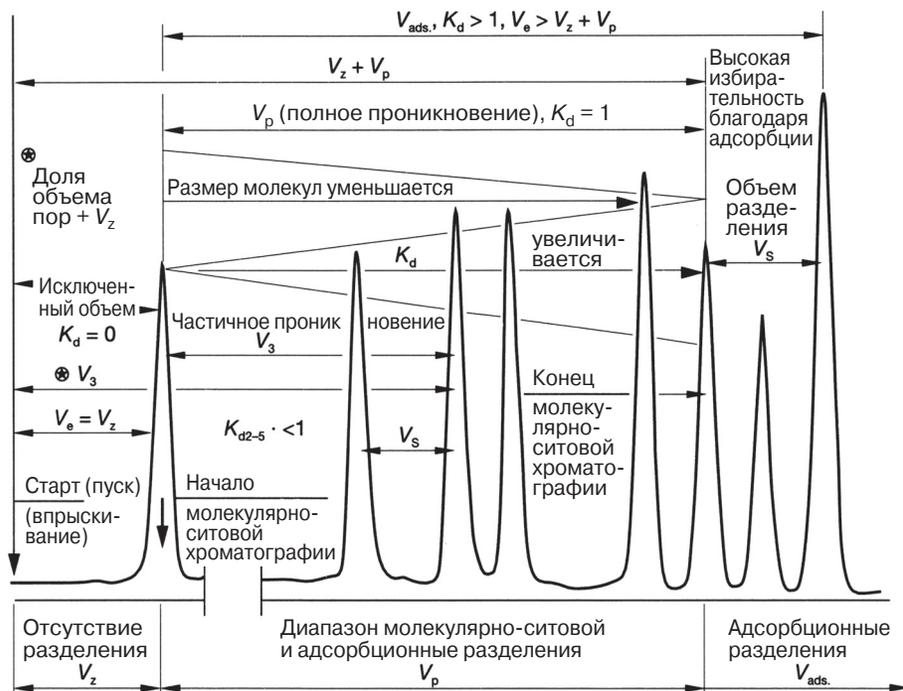


Рис. Е.3

ма элюирования веществ. Исходя из этого, степень разделения R определяется следующим образом:

$$R = \frac{V_2 - V_1}{\frac{1}{2}(W_1 + W_2)},$$

где $V_2 - V_1$ – расстояние между вершинами пиков, W_1 и W_2 – ширина зоны или ширина пика двух разделенных веществ.

Степень разделения R , как известно, зависит от коэффициента емкости k' , коэффициента избирательности α (относительное удерживание) и производительности колонки, которая измеряется по количеству теоретических тарелок N .

Названные параметры определяются следующим образом:

$$k' = \frac{V_1 - V_z}{V_z} \quad \alpha = \frac{V_2 - V_z}{V_1 - V_z} \quad N = 16 \left(\frac{V}{W} \right)^2.$$

Они связаны со степенью разделения R по следующему известному уравнению:

$$R = \frac{1}{4} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{k'}{1 + k'}.$$

Разделения можно достичь эффективнее всего путем изменения коэффициента избирательности α .

Улучшение и изменение избирательности на Сефадексе LH-20 может быть очень хорошо реализовано с помощью чистых растворителей. Для этого требуется максимально 4 колонки с растворителями метанол, ацетон, метилхлорид и вода в качестве подвижной фазы.

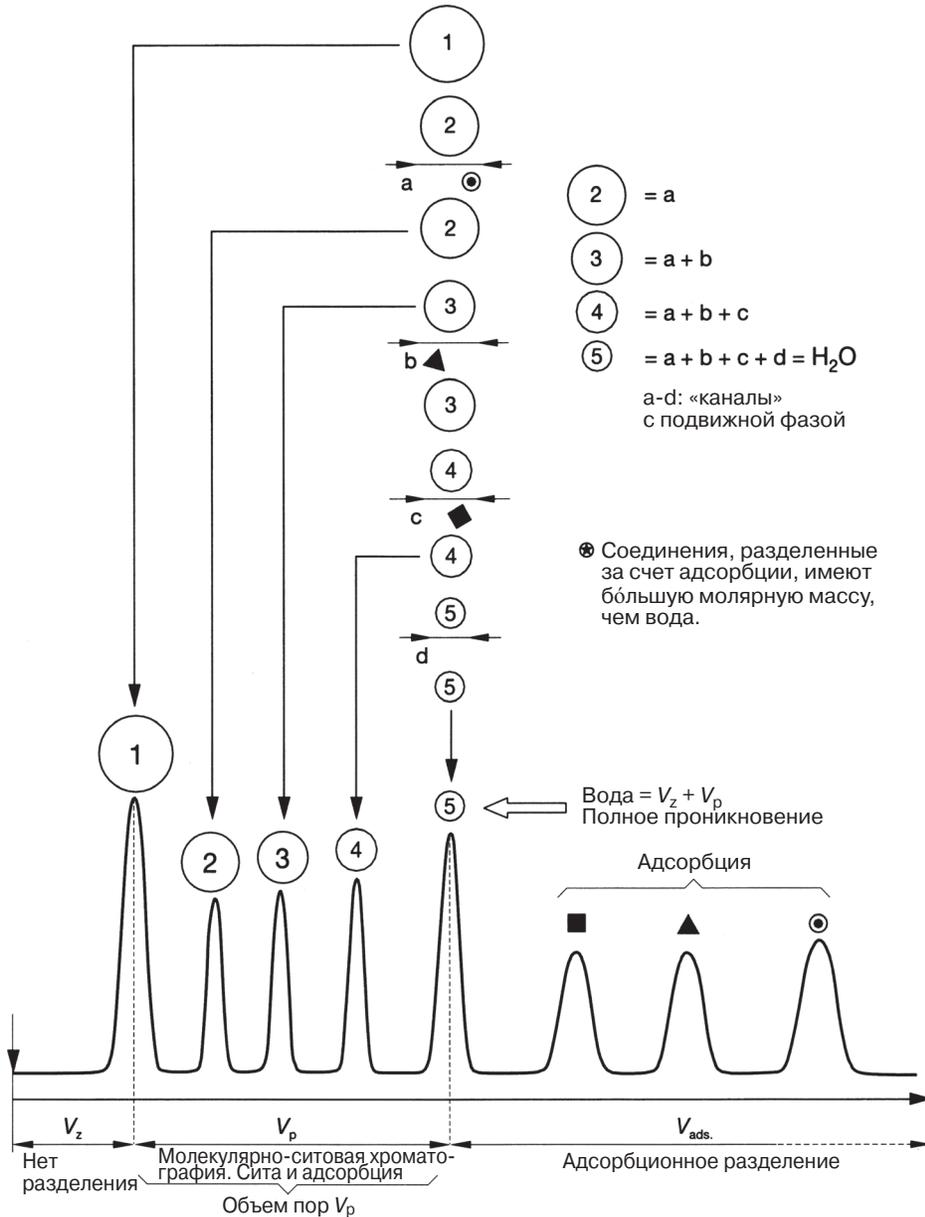


Рис. Е.4

Улучшение селективности на Сефадексе LH-20 обозначает, что, например, для разделения смеси метанолом требуется 5-метровая колонна, а с помощью ацетона достаточно уже высоты гелевого слоя 870 мм, при разделении же метилхлоридом достаточно всего лишь высоты гелевого слоя в 200...350 мм.

Изменения и улучшения селективности в смысле перемены последовательности элюирования можно также наблюдать при смене подвижной фазы.

В молекулярно-ситовой хроматографии объем элюирования V_e любого низкомолекулярного вещества можно формулировать следующим образом:

$$V_z < V_e < V_z + V_p.$$

Однако это формулирование ничего не говорит о возможном отставании внутри объема пор V_p . Замедляется ли определенное вещество декстрангелем и насколько при элюировании адсорбировано, можно легко определить исключительно с помощью тестовых веществ.

Для этого лучше всего использовать соединения с идентичными молярными массами, которые элюируются в зоне объема пор V_p . Однако если объем элюирования $V_e > V_z + V_p$, то соединение удерживается за счет адсорбции, т. е. оно появляется позже $V_z + V_p$ и выражается иначе:

$$V_e = V_{ads}.$$

На рис. Е.4 представлен обращенный ситовой эффект благодаря становящимся все уже порам и каналам, которые заполнены подвижной фазой. В практической части будет показано, что в диапазоне объема пор, т. е. между пиками 1 и 5, также возможно разделение за счет адсорбции. Чисто адсорбционно-хроматографические разделения осуществляются, как уже говорилось, в диапазоне объема элюирования по формуле $V_z + V_p$, и, таким образом, значения $K_d > 1$.

ГЛАВА I

АНАЛИТИЧЕСКИЕ РАЗДЕЛЕНИЯ

Под аналитическими разделениями подразумеваются методы быстрого качественного, а также количественного определения веществ в смесях синтетического или натурального происхождения. Под термином «качественный» понимается идентификация отдельных компонентов пробы с помощью значений R_f (хроматография на бумаге и тонкослойная хроматография) или на основе времени удержания (хроматография на колонке, т. е. ЖХ- и ГХ-жидкостная и газовая хроматография). При количественном определении после проведенной калибровки измеряются пятна в хроматографии на бумаге и в тонкослойной хроматографии. В хроматографии на колонке, жидкостной и газовой хроматографии количественная оценка компонентов смеси – равным образом и по предшествовавшей калибровке – проводится посредством стандартов на основе площади пика, реже высоты пика.

В разделах 3.2.1 до 4.1.3 будут представлены различные аналитические и препаративные разделения с помощью ТСХ и ВЭЖХ. Здесь описание приборов и колонок будет дано лишь кратко; больше информации можно почерпнуть из общеизвестных монографий (см. список литературы). Далее в краткой форме будет представлено устройство аппаратуры ВЭЖХ. Автор полностью отказывается от описания приборной части и ее компоновки, особенно в количественной тонкослойной хроматографии, так как в этой книге, ориентированной на практическое применение, она является в основном пилотным методом. Приборы для ВЭЖХ имеются в модульной и компактной конструкции. Выбор аппаратуры зависит от недостатков и преимуществ, которые выявляются при соответствующем случае применения. Модульные установки ВЭЖХ имеют большое преимущество в том, что при необходимости отдельные приборы, такие как, например, насос или детектор, быстро могут быть заменены.

1.1. Приборы (устройства)

Аппаратура ВЭЖХ состоит из следующих компонентов:

- сборник для подвижной фазы (элюента),
- насос,
- градиентная система,
- дозатор для проб,
- колонка и наполнитель для нее,
- детектор
- прибор регистрации и обработки данных.

1.1.1. Насосы

В ВЭЖХ чаще всего применяются насосы с одним и сдвоенным поршнями с коротким ходом. Поршень в большинстве случаев состоит из сапфира (оксида алюминия). Верхняя часть поршня, а также все детали, которые соприкасаются с элюентом, выполнены из устойчивой против коррозии нержавеющей стали. Наряду с поршневыми насосами с коротким ходом используются также таковые с длинным ходом и мембранные насосы.

Аналитические насосы ВЭЖХ должны соответствовать следующим требованиям:

- регулируемая норма (скорость) потока в диапазоне 0,1...10 мл/мин,
- стабильность потока $\pm 2\%$ и лучше при противодавлении до 250 бар.

1.1.2. Градиентные системы

Градиентные системы служат для того, чтобы во время элюирования многокомпонентной смеси проб непрерывно изменять состав подвижной фазы. Благодаря изменению процента содержания двух или трех растворителей в элюенте изменяют его элюиционную силу и только благодаря этому достигают удовлетворительного разделения. Другими словами, с помощью градиентов растворителей, аналогично температурному градиенту (перепаду) в ГХ, создается оптимальная система разделения для смеси веществ.

Существует 2 системы градиента, а именно градиенты низкого и высокого давления. Если происходит смешивание растворителей на стороне низкого давления насоса, то говорят о градиенте низкого давления, и наоборот.

1.1.3. Дозатор для проб

Ввод проб в верхнюю часть колонки осуществляется, как правило, через 6-канальный поворотный кран, который можно обслуживать вручную или через электронное управление. Объемы завихрений проб, вводимых в дозирующую петлю через нагнетательные клапаны, задаются исходя из выбора размеров колонок, длины и внутреннего диаметра. Объемы завихрений проб могут составлять 1...250 мкл, при этом в аналитической ВЭЖХ чаще всего используются таковые в 10 или 20 мкл.

1.2. Колонки

Колонка, будь то жидкостная или газовая хроматография, является основой любой разделительной аппаратуры, так как именно в ней происходит разделение. Разделения могут достигаться благодаря оптимизации разделительной системы, которая состоит из наполнителя колонки и подвижной фазы. Улучшенные кривые (пики) с помощью компьютеров скорее скрывают правильный результат разделения.

В аналитической ВЭЖХ, наряду с собственно разделительными колонками, используют также предварительные колонки, которые должны препятствовать химическому или механическому загрязнению основной колонки. Предваритель-

ная колонка, примерно 4...5 см длиной, содержит, как правило, тот же наполнитель, что и разделительная колонка.

Колонки состоят из трубы из нержавеющей стали, которые на обоих концах имеют резьбовое соединение. Спекшаяся масса (агломерат), которая удерживает содержимое колонки, крепится с помощью уплотнения на верхней части колонки. Внутренний размер чаще всего применяемых аналитических колонок составляет 4×125 мм или 4×250 мм. Более точные данные относительно колонок и их конструкции можно получить в фирменных изданиях или цитируемом ранее «Руководстве по ВЭЖХ».

1.3. Наполнители колонки

Наполнители колонки, названные также неподвижными фазами, состоят в основном из двух различных материалов: на основе силикагеля и структурированных органических полимеров. На немодифицированных силикагелях адсорбционно-хроматографические разделения проводятся, как правило, с помощью смесей органических растворителей в качестве подвижных фаз. Поверхностно-модифицированные силикагели по своим свойствам и их применению подразделяются, как в следующих разделах.

1.3.1. Силикагели и структурированные органические полимеры

При этом различаются следующие фазы.

- Химические модифицированные полярные силикагельные фазы с гидроксильными, нитриловыми, нитро- и аминоконцевыми группами для адсорбционных разделений.
- Силикагелевые фазы с обращенной фазой с *n*-октадецил-, *n*-октил-, метил- и фенил-группами.
Эти фазы обладают как гидрофильными, так и гидрофобными свойствами и поэтому могут применяться разносторонне. С полярными подвижными фазами элюирование осуществляется по снижающейся полярности.
- Неподвижные фазы с ионными группами, такими как $-\text{SO}_3\text{H}$ и $-\text{COOH}$ в качестве сильных и слабых катионообменников. Есть также сильные и слабые анионообменники с функциональными группами ($-\text{NR}_3\text{OH}$) и ($-\text{NH}_3\text{Cl}$). В качестве основного материала наряду с силикагелями используются также структурированные органические полимеры.

В эксклюзионной или молекулярно-ситовой хроматографии используются как силикагели, так и структурированные органические полимеры, которые обладают более узким или более широким спектром пор. При наличии 2–3 таких колонок, которые имеют различные размеры пор, можно перекрыть большие диапазоны молекулярных весов, это значит, что с помощью последовательно соединенного набора колонок можно хорошо разделить и охарактеризовать смеси веществ разной молярной массы. Подробные сведения относительно гель-проникающей хроматографии (ГПХ), названной также методом эксклюзионной хроматографии, можно

найти в различных монографиях о ЖХ. Есть монографии, которые занимаются исключительно ГПХ. Следует указать на материалы для аффинной хроматографии.

1.4. Подвижные фазы

Подвижные фазы, называемые также элюентом, действуют как растворитель и средство переноса для растворенной смеси веществ. У немодифицированных и химически полярно связанных силикагелей следующие растворители в разных комбинациях используют в качестве подвижных фаз: 1-пентан, 1-гексан, циклогексан, дихлорметан, ацетон, тетрагидрофуран, диоксан и сложный этиловый эфир уксусной кислоты, если называть только наиболее часто используемые. Благодаря модифицированию поверхности с помощью гидрофобных групп, таких как 1-октадецил, 1-октил, метил или фенилен, получают наполнители для колонок, которые применяют в основном для разделений по снижающейся полярности. Для этого используют смеси из следующих растворителей в качестве подвижных фаз: вода, метанол, ацетонитрил, пропанол, тетрагидрофуран и диоксан. В отдельном случае могут использоваться также другие растворители или смеси в качестве элюентов. В гл. 3 будут даны предложения, какие подвижные фазы, чистые растворители или смеси, с какими наполнителями колонок комбинируются, чтобы образовать оптимальную разделительную систему.

1.5. Детекторы

Детекторы для ВЭЖХ имеют проточную ячейку, через которую непрерывно проходит элюат, при этом измеряются изменения в потоке жидкости. Могут быть физические или химические свойства, которые определяются в компонентах пробы с помощью избирательных индикаторных приборов, таких как ультрафиолетовые, флюоросцентные и электрохимические детекторы, а также универсальные и часто применяемые приборы, такие как детектор показателей расчета.

1.6. Устройства для сбора и обработки данных

Самый простой способ регистрации сигнала детектора осуществляется с помощью самописца, и используют его чаще всего при разработке метода. Интегрированные устройства, напротив, служат для обработки, распечатки и сохранения в памяти хроматограмм и их данных.

ГЛАВА 2

ПРЕПАРАТИВНОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

Препаративное разделение всегда служит для выделения чистых веществ из продуктов реакции или смесей природных веществ, независимо от того, в каких количествах мг, г или кг они проводятся. При выделении чистых компонентов из смесей веществ нужно всегда помнить о том, что хроматографические методы или процессы имеет смысл использовать лишь тогда, когда другие способы разделения, такие как перегонка, кристаллизация, экстракция и т. д., не приводят к желаемому результату. Следующие критерии, без претензии на полный охват, отвечают на вопрос: с какой целью проводится препаративное разделение:

- наработка стандартных веществ или веществ сравнения для аналитических хроматографических методик, включая: ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография), ГХ (газовая хроматография) или ВЭТСХ (высокоэффективная хроматография в тонком слое сорбента);
- идентификация, качественное и количественное изучение продуктов химических реакций или процессов;
- выделение и очистка полупродуктов или очистка конечного продукта химического синтеза;
- регенерация ценных исходных компонентов синтеза;
- выделение примесей из конечного продукта синтеза для изучения их структуры и степени токсичности;
- очистка биологически активных веществ при синтезе фармацевтических субстанций;
- выделение и очистка природных биологически активных веществ для экспериментального изучения;
- выделение и очистка природных индивидуальных компонентов из экстрактов на основе растительного сырья.

Процессы препаративного разделения при низком давлении рассматриваются в гл. 6. Процессы препаративного разделения при высоком давлении часто применяются для получения индивидуальных веществ в промышленном масштабе. Более точные описания их можно найти в различных публикациях и монографиях, а также фирменных изданиях.

Хотя препаративное разделение при низком давлении может продолжаться многие часы, его использование не следует категорически отклонять. Для окупаемости процесса разделения в промышленных масштабах продолжительность его должна быть сокращена. С помощью автоматической дозировки проб и фракционирования элюата можно проводить длительные процессы разделения в ночные часы. Для повышения эффективности процесса и гарантии количественного разделения возможно увеличение длины хроматографической колонки. Такой процесс, как уже упоминалось, можно проводить в ночные часы. Этот вариант опти-

мизации разделения дешевле, чем поиск более эффективной системы разделения, что, исходя из опыта, может занять до двух дней.

Цели и задачи препаративной ЖХ могут быть представлены так же, как на рис. Е.1.

2.1. Приборы

Оборудование и приборы для препаративной жидкостной колоночной хроматографии по конструкции сравнимы с аналитическими приборами. Сборник для подвижной фазы, насос, система ввода пробы, колонка и материал для заполнения колонки, а также детектор самописец или интегратор аналогичны по своим функциям. Отличие в оборудовании для препаративного разделения состоит в том, что дополнительно нужны коллектор фракций и ротационный испаритель для их концентрирования, обогащения и выделения. Оборудование и приборы обычно подбирают к процессу препаративного хроматографического разделения: производительность насоса, объем дозатора, конструкционные особенности колонки.

2.1.1. Насосы

Детальное описание и принцип работы насосов можно найти в монографиях по жидкостной колоночной хроматографии. Для различных видов препаративного хроматографического разделения можно использовать следующие марки насосов:

- Duramat® 80 – Pro Minent B,
- Sepapress PCP – 150/75 – Constakron 3 и 4,
- Buechi 681 – Desaga KP 2000,
- Gilson Modell 302,

а также насосы многих других производителей.

В случае необходимости, например при работах с мягкими, сильно набухающими гелями типа Сефадекс LH-20, используют различные демпфирующие системы для снижения пульсации насоса. В препаративной жидкостной хроматографии низкого и среднего давления используют демпферы, работающие в диапазоне 1...6, 0...20 и 0...50 бар. Полное устранение пульсации достигается путем установки проточных, стальных или тефлоновых капиллярных демпферов (5...10 м) между насосом и хроматографической колонкой.

2.1.2. Подготовка проб

Подготовка пробы для аналитической или препаративной жидкостной колоночной хроматографии заключается в удалении нежелательных компонентов, как растворимых, так и нерастворимых. Удаление нежелательных примесей осуществляют путем фильтрации, дистилляции, экстракции, центрифугирования или кристаллизации. Установка предколонок или дополнительных колонок позволя-

ет исключить из пробы нежелательные вещества и защитить сорбент основной колонки от вредного химического или механического воздействия.

2.1.3. Дозировка проб

Система ввода пробы осуществляется устройствами, способными количественно наносить смесь разделяемых веществ в головную часть разделительной колонны. Введение пробы может осуществляться вручную или с помощью автоматических устройств.

Ручной ввод пробы производится с помощью 6-портового петлевого дозатора. Эти дозаторы в зависимости от конструкции могут выдерживать давление до 35 бар и поставляются различными производителями.

Устройства, работающие в автоматическом режиме, сравнимы с ручными дозаторами. Ввод пробы производится через заданный промежуток времени автоматически. Простая система ввода пробы представлена автором. С помощью 3-ходового шарового крана и электронного привода можно с любыми интервалами регулировать объем пробы.

2.2. Колонки

В препаративной жидкостной колоночной хроматографии применяются колонки из стали, стекла и пластмассы. Стальные колонки используются для разделения при высоком давлении. Стеклянные, а также пластмассовые колонки находят свое применение в хроматографии низкого и среднего давления. В настоящем издании рассматриваются исключительно стеклянные колонки, работающие при низком давлении. Определение параметров стеклянных колонок, будь то длина и/или внутренний диаметр, может быть очень разным, как это можно будет заключить из последующей компоновки.

Очень важными конструкционными элементами этих колонок являются наконечники или адаптеры, регулируемые или не регулируемые. При использовании жестких сорбентов, например силикагелей, применяются в основном два нерегулируемых наконечника. При использовании для заполнения колонок мягких, набухающих сорбентов (гелей) хотя бы один наконечник должен быть с регулировкой. Регулируемые адаптеры позволяют корректировать высоту слоя геля при загрузке и перезагрузке колонки. При выборе адаптера необходимо обращать внимание на его конструкцию для оценки возможности провести ремонт собственными силами при появлении негерметичности системы.

2.3. Материалы для заполнения колонки

Колонки, заполненные сорбентами в комбинации с подвижными фазами, являются основой любой хроматографической разделительной установки. Неподвижные фазы или сорбенты можно разделить на две основные группы (обозначение «неподвижная фаза» для сорбентов не всегда адекватно, так как элюент, находящийся в геле или порах сорбента, оказывает влияние на процесс разделения компонентов пробы):

- жесткие сорбенты, устойчивые к высоким давлениям, на основе модифицированных или не модифицированных силикагелей и синтетических сополимеров с большим числом поперечных связей;
- мягкие сильно набухающие гели, чувствительные к давлению, на основе природных и синтетических полимеров с малым числом поперечных связей.

2.3.1. Силикагели

Немодифицированные силикагели разделяют компоненты пробы по нарастающей полярности. Сильно полярные или основные соединения в значительной степени отстают из-за взаимодействия с кислотными силановыми группами или же необратимо адсорбируются по сравнению с нейтральными веществами. В таких случаях помогает добавка диэтиламина в незначительных количествах, чтобы деактивировать полярный силикагель и тем самым избежать вышеназванных эффектов. В качестве подвижных фаз, как правило, используют безводные смеси растворителей. Недостатком силикагеля является проблема с его регенерацией. Гель в большинстве случаев выгоднее утилизировать, чем с большим трудом очистить различными растворителями. Как в немодифицированном силикагеле избирательно разделить сложные смеси веществ с различной полярностью с помощью ступенчатого (каскадного) элюирования, будет показано в разделе 5.4.

Гидрофобные силикагели, обращенные фазы С-8 и С-18, разделяют вещества с помощью водно-метаноловой или водно-ацетонитриловой смеси по убывающей полярности. Чем выше доля органического растворителя в подвижной фазе, тем сильнее элюирование, и наоборот.

2.3.2. Структурированные органические полимеры

Из набухающих гелей, синтетических полимеров используется в основном декстрангель Сефадекс ЛН-20 и в незначительном объеме Сефадекс G-10 а также Сефадекс ЛН-60. Большим преимуществом Сефадекса ЛН-20 является то, что на этом наполнителе колонки можно очень выборочно производить разделение с помощью чистых растворителей в качестве подвижных фаз. Ни с каким другим полимерным гелем даже приблизительно нельзя достигнуть сравнимых разделений.

2.4. Подвижные фазы

Как уже упоминалось, при использовании немодифицированного силикагеля или его вариантов с модифицированной поверхностью применяют смеси растворителей в качестве подвижных фаз, так как только так возникают селективные (избирательные) системы разделения, таков широко распространенный опыт. Но на немодифицированном силикагеле можно достичь хорошего разделения и с помощью чистых органических растворителей, таких как дихлорметан, этилацетат или ацетон, применяемых в качестве подвижных фаз. Годится ли растворитель и насколько хорошо он подобран, можно установить на основе тонкослойного разделения. При использовании обращенной фазы можно в большинстве случаев достичь хорошего разделения с помощью чистого органического растворителя вме-

сто водно-метаноловой или водно-ацетонитриловой смеси, при условии, что будут последовательно соединены две или больше колонок. Так как эти препаративные разделения могут проходить вне рабочего времени (например, ночью) более высокая затрата времени не обязательно является недостатком. Чистые органические растворители имеют следующие практические преимущества:

- пробы лучше растворяются;
- для разделяемых веществ (субстанций) безводная подвижная фаза является более щадящей при изолировании;
- регенерация элюента менее проблематична, происходит быстрее, почти без потерь и, таким образом, выгоднее.

Если применяют декстрангель Сефадекс LH-20, то с помощью чистых растворителей, таких как метанол, ацетон, дихлорметан, этилацетат или вода, можно очень избирательно провести детерминированное разделение. Полярный декстрангель по сравнению с тоже полярными, но кислотными силикагелями обладает тем преимуществом, что адсорбция веществ очень редко заканчивается необратимо.

Хорошая растворимость в так называемом растворителе или в других, которые находят применение в качестве подвижной фазы, является гарантией того, что компоненты пробы количественно вымываются (элюируются).

2.5. Детекторы

Детекторы должны выполнять в колоночно-жидкостной хроматографии две задачи:

- распознавание, т. е. детектирование разделенных субстанций,
- количественная оценка разделенных соединений по пиковой площади или высоте после поверки (калибровки) с помощью стандарта.

Тем самым они служат в общем качественному и количественному распознаванию веществ, которые появляются в элюате на конце колонки. В препаративной колоночно-жидкостной хроматографии в основном применяются дифференциальные рефрактометры и ультрафиолетовые детекторы. Эти и другие детекторы можно получить, например, на следующих фирмах:

- Latak, D-69214 Eppelheim,
- Knauer, D-14163 Berlin,
- Bischoff, D-71229 Leonberg,
- Waters, D-65760 Eschborn,
- Kontron, D-85375 Neufarn.

2.6. Коллектор фракций

Коллектор фракций применяют тогда, когда нужно собирать хроматографически разделенные фракции, т. е. в основном при препаративном разделении. Собранные фракции, как правило, освобождаются от элюента на ротационном испарителе. Вещества, изолированные таким путем, можно, если требуется, идентифи-

цировать или использовать для других реакций. И аналитические стандарты, которые нельзя купить, можно изолировать таким же путем.

Фракционирование выполняется по времени и количеству жидкости, будь то в маленьких или больших пробирках или в больших резервуарах. При производственном разделении используют, как правило, фракционные клапаны, так как собираются лишь незначительные объемы элюата. Различные фракционные сборники можно приобрести, например, на фирмах Büchi и Pharmacia/LKB. О других приборах, других изготовителей, можно извлечь информацию из лабораторных изданий.

2.7. Приборы по регистрации и обработке данных

Регистрационные приборы имеют задачу отразить вещества, элюированные из колонок и регистрируемые детекторами, в форме профиля элюирования (пики) и тем самым сделать пригодными для количественной и качественной оценки хроматограмм. В препаративной колоночно-жидкостной хроматографии в качестве регистрирующих приборов применяются в основном одно- и двухканальные плоские самописцы с жестким и варьируемым диапазоном измерения. Какой самописец выберет пользователь, это его дело, есть много хороших приборов.