

Высокоэффективная газовая хроматография

Редактор К. ХАЙБЕР

Введение	3
Теория капиллярной хроматографии.....	4
Капиллярная колонка.....	14
Ввод пробы в капиллярную колонку.....	30
Хроматографическое оборудование	67
Многомерная газовая хроматография и гибридные методы	77
Качественный и количественный анализ	92
Оценка работы газохроматографической системы и устранение неисправностей	97
Применение капиллярной газовой хроматографии.....	105
Приложение I.....	133
Приложение II	133
Приложение III	134

Введение

Газожидкостная хроматография как метод разделения основана на распределении компонентов смеси между двумя фазами, из которых газовая является подвижной, а жидкая неподвижной. В классической газовой хроматографии компоненты смеси переносятся подвижной фазой вдоль колонки, заполненной частицами Твердого носителя, которые покрыты неподвижной фазой (НФ). В высокоэффективной, или капиллярной, газовой хроматографии используются колонки без носителя, а пленка НФ наносится на внутреннюю поверхность колонки. Этот тип колонок, предложенный Голеем в 1957 г., обеспечивает значительно большую эффективность разделения по сравнению с обычными насадочными колонками, откуда и появился термин *высокоэффективная* газовая хроматография.

Традиционно капиллярная газовая хроматография применялась для разделения:

- сложных смесей
- компонентов с близкими химическими и физическими свойствами
- смесей, состоящих из большого числа разнообразных веществ

Однако капиллярная хроматография, в которой применяются хрупкие стеклянные открытые колонки и достаточно сложное оборудование, никогда не считалась "практичным" методом.

Отношение к высокоэффективной хроматографии резко изменилось, когда в 1979 г. благодаря работам Дандено и сотр. в компании Hewlett-Packard [1] появились гибкие колонки из плавленого кварца. Присущие этому материалу прочность и гибкость делают капиллярные колонки более удобными в применении и менее хрупкими, чем стеклянные. Кроме того, поверхность плавленого кварца более инертна, что уменьшает адсорбцию компонентов на стенках и улучшает функционирование колонок.

В 1983 г. на 2-м Международном симпозиуме по капиллярной хроматографии (Tarrytown, NY, USA) кампания Hewlett-Packard сделала еще один шаг в развитии газовой хроматографии с открытыми колонками — впервые были представлены коммерчески выпускаемые колонки большого диаметра как альтернатива насадочным колонкам. Это позволило применять капиллярную хроматографию для анализа летучих соединений и менее сложных смесей. Преимущества кварцевых колонок в сочетании с обычным хроматографическим оборудованием, предназначенным для работы с насадочными колонками, сделали газовую хроматографию с открытыми колонками большого диаметра более удобной и приспособленной для рутинных анализов [2, 3].

В 3-м изданий книги "Высокоэффективная газовая хроматография" рассматриваются исключительно открытые колонки из плавленого кварца, а также другие достижения в технологии изготовления колонок и разработке оборудования, приведшие к столь бурному развитию высокоэффективной хроматографии со времени выхода 2-го издания книги.

Литература

1. Dandeneau J. D., Zerenner E. H. 1979. HRC & CC, 2, 351-356.
2. Ryder B. L., Phittips J., Plotczyk L. L., Redstene M. "Flexible Fused Silica—The Packed Column Alternative???", presented at Pittsburgh Conference and Exhibitors, Atlantic City, NJ, March .1984.
3. Larson P., Newton B. February 1986. HP Technical Paper No 115, Publication No. 43-5954-7555.

Теория капиллярной хроматографии

К. Дж. Хайвер

Решающим моментом при разработке методики газохроматографического анализа является определение величины степени газо-хроматографического разделения, необходимой для достижения цели. Степень разделения в хроматографии определяется следующим образом:

$$R = 2(t_{Rj} - t_{Ri})(W_{b,j} + W_{b,i})$$

где t_R — время удерживания соединений i и j ; W_b — ширина пиков у основания.

Способность хроматографической системы разделять "критическую пару" веществ (т. е. два наиболее трудно разделяемых соединения) зависит не только от их абсолютных времен удерживания, но и от формы пиков этих соединений, т. е. от эффективности разделительной колонки.

Одинаковых величин разрешения (степени разделения) можно достичь при использовании как высокоэффективных хроматографических систем, так и систем с низкой эффективностью (рис. 1-1). Степень разделения является сложной функцией следующих хроматографических параметров: удерживания, эффективности и селективности хроматографической колонки:

$$R = \sqrt{\frac{n}{4}} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k}{k + 1} \right)$$

где n — эффективность колонки, выражаемая числом теоретических тарелок; α — фактор селективности; k — коэффициент извлечения, или коэффициент емкости колонки.

Для насадочных колонок, характеризующихся низкой эффективностью, наибольший вклад в величину разрешения вносит селективность (рис. 1-1). Этим объясняется необходимость широкого ассортимента неподвижных фаз (НФ) в газовой хроматографии с насадочными колонками. В случае высокоэффективных

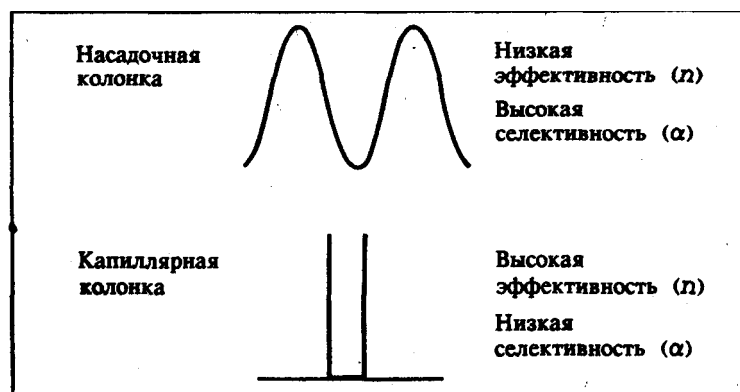


Рис. 1-1. Одинаковое разрешение, достигаемое в газовой хроматографии с насадочными и капиллярными колонками.

открытых капиллярных колонок такая степень разрешения J стирается с использованием нескольких выбранных НФ. В этой главе будут рассмотрены понятия эффективности, селективности и удерживания в высокоэффективной газовой хроматографии и взаимосвязь этих параметров при оптимизации разделения. Используемые обозначения и термины приведены в приложении I.

"Несколько слов о термине "открытая капиллярная колонка". В последнее время после 30 лет его повсеместного и общего использования как эквивалента английскому термину "open capillary column" ряд хроматографистов стали рекомендовать использовать иной термин, а именно "полая капиллярная колонка". Последний термин, по мнению реформаторов, представляет собой более точный перевод соответствующего английского термина. Поскольку, перефразируя известное утверждение можно считать, что "замена термина ведет к беспорядку", проанализируем доводы реформаторов, используя книгу: С. И. Ожегов "Словарь русского языка" (М., Русский язык, 1988). Согласно этому словарю, "полый — пустой внутри", например "полая трубка". Поэтому полая капиллярная колонка по смыслу эквивалентна пустой капиллярной трубке, а не капиллярной колонке, ибо на стенках капиллярной колонки отличие от пустой трубки обязательно находится слой сорбента или сорбента. Следовательно, введение нового термина вряд ли обоснован — *Прим, ред.*

Хроматографическое удерживание

Наделение пробы на индивидуальные компоненты достигается в соответствии с удерживанием каждого компонента хроматографической колонкой. Время, необходимое для элюирования компонента из колонки, называется (абсолютным) временем удерживания (t_R) и определяется по времени выхода максимума его хроматографического пика. В процессе хроматографического разделения происходит распределение компонента пробы между подвижной и неподвижной фазами. Время нахождения компонента в подвижной фазе (t_m) постоянно для всех составляющих анализируемой смеси. Величину t_m обычно называют "мертвым временем" колонки или временем удерживания несорбирующегося вещества. Эту величину можно легко определить по времени удерживания сорбирующегося в колонке вещества, например метана. Однако Казано, что математический расчет мертвого

времени является более точным [1,2].

Истинное время нахождения компонента в НФ рассчитывается как разность абсолютного времени удерживания и мертвого времени. Эта величина называется приведенным (исправленным) временем удерживания t_R^l и определяется уравнением

$$t_R^l = t_R - t_m \quad (1.3)$$

Связь между величинами t_R , t_m и t_R^l иллюстрируется рис. 1-2.

"Распределение анализируемого вещества между двумя фазами хроматографической колонки можно описать с помощью коэффициента распределения K_D ."

$$K_D = C_{i,s}/C_{i,m}, \quad (1.4)$$

где $C_{i,s}$, $C_{i,m}$ — концентрация вещества i в неподвижной и подвижной фазах соответственно.

Коэффициент распределения — термодинамическая величина;

при определенной температуре колонки каждое вещество характеризуется постоянным коэффициентом распределения.

Коэффициент емкости колонки (k) — это мера молярного распределения анализируемого вещества между НФ и газовой фазой. Эта величина определяется экспериментально как отношение времени нахождения компонента в НФ ко времени его нахождения в газовой фазе;

$$k = n_{i,s}/n_{i,m} = t_R^l/t_m, \quad (1.5)$$

где $n_{i,s}$ и $n_{i,m}$ — число молей компонента i в НФ и подвижной фазе соответственно. Коэффициент емкости связан с коэффициентом распределения следующим образом:

$$K_D = kb, \quad (1.6)$$

где b — фазовое отношение. Фазовое отношение — это отношение объема колонки, занятого газовой (или подвижной) фазой (V_m) к объему колонки, занятому НФ (V_s):

$$b = V_m/V_s \quad (1.7)$$

Для открытых капиллярных колонок со слоем НФ на внутренних стенках (WCOT-колонки), имеющих внутренний радиус r , фазовое отношение (b) обратно пропорционально толщине пленки жидкой фазы:

$$b = r/2d \quad (1.8)$$

Обычно значения b для капиллярных колонок составляют 50-500. Чем тоньше пленка неподвижной фазы, тем выше значение b .

Для представления величин удерживания в газовой хроматографии используется система индексов удерживания Ковача. Индексы удерживания Ковача не зависят от ряда инструментальных переменных, например от объемной скорости потока. Это позволяет проводить сравнение величин удерживания, полученных в различных хроматографических системах. Индексы удерживания Ковача стали основой для идентификации веществ в хроматографии. Использование индексов удерживания при проведении качественного анализа рассмотрено в гл. 6.



Рис. 1-2. Связь между абсолютным и приведенным временем удерживания.

Изотермический индекс удерживания I_a^s описывает удерживание компонента a на неподвижной фазе s как некоего гипотетического n -алкана. Изотермический индекс удерживания соединения вычисляется по формуле, в которую входят приведенные времена удерживания двух соседних с ним членов гомологического ряда:

$$I_a^s = 100N + 100n(\lg t_{R,a}^l - \lg t_{R,N}^l) / (\lg t_{R,(N+n)}^l - \lg t_{R,N}^l), \quad (1.9)$$

Где N — число атомов углерода в n -алкане с более короткой цепочкой; n — разность в числе атомов углерода между двумя алканами, используемыми как стандарты. Подробно система индексов удерживания Ковача рассмотрена в работе Будахеджи и сотр. (4) Керверс и сотр. [5, 6] предложили методику прогнозирования индексов удерживания при программировании температуры. Эта методика основана на использовании данных, полученных в изотермических условиях.

Эффективность разделения

Эффективность разделения — это мера расширения зоны вещества при его прохождении через колонку. Эффективность определяется соотношением времени удерживания вещества и стандартного отклонения его пика (см. уравнение 1.10). Исходя из допущения о том, что хроматографический пик описывается кривой Гаусса, можно рассчитать эффективность колонки, выраженную числом теоретических тарелок n :

$$n = (t_R/\sigma)^2 \quad (1.10)$$

Стандартное отклонение пика σ можно рассчитать по его ширине (рис. 1-3).

Таким образом, эффективность колонки можно выразить через ширину пика на половине его высоты W_h или ширину пика у его основания W_b :

$$n = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2, \quad (1.11)$$

$$n = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad (1.12)$$

Обычно измеряют ширину пика на половине его высоты, поэтому для расчета эффективности колонки, как правило, применяют

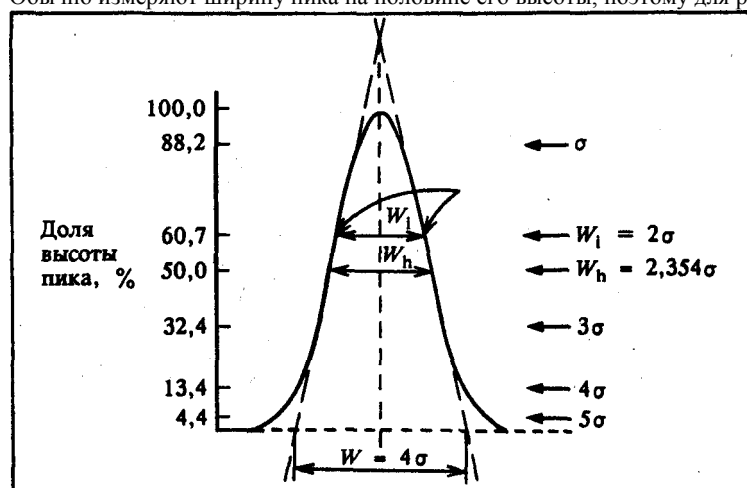


Рис. 1—3. Измерение ширины пика на разной высоте и значения стандартного отклонения гауссовского пика.

уравнение (1.11). На практике часто используют удельную эффективность, т. е. отношение эффективности колонки к ее длине (L). Удельная эффективность определяется как число теоретических тарелок на метр длины колонки (n/L).

Эффективность хроматографической колонки можно так выразить высотой, эквивалентной теоретической тарелке (h , или ВЭТТ), — это длина участка колонки (в миллиметрах), соответствующего одной теоретической тарелке:

$$h = L/n. \quad (1.13)$$

Следовательно, эффективность колонки тем выше, чем больше число теоретических тарелок n и меньше их высота h .

Поскольку истинная разделительная способность колонки связана с продолжительностью пребывания компонента в НФ, эффективность может также выражаться через приведенное время удерживания. В этом случае для оценки эффективности используют число эффективных теоретических тарелок N :

$$N = 5,545 \left(\frac{t'_R}{W_h} \right)^2 \quad (1.14)$$

Число эффективных теоретических тарелок связано с числом теоретических тарелок через коэффициент емкости

$$N = n \left(\frac{k}{k+1} \right)^2 \quad (1.15)$$

По аналогии с уравнением (1.13) высота, эквивалентная эффективной теоретической тарелке (H , или ВЭЭТТ), определяется выражением

$$H = L/N. \quad (1.16)$$

В теориях, описывающих влияние хроматографических параметров на эффективность колонки, используется величина ВЭТТ. Фундаментальным уравнением, описывающим функционирование хроматографической колонки, является уравнение Ван-Деемтера. В этом уравнении эффективность колонки представлена как функция средней линейной скорости подвижной фазы, u . В сокращенной форме классическое уравнение Ван-Деемтера имеет вид

$$h = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (1.17)$$

где член A отражает вклад вихревой диффузии и характеризует природу и структуру насадки; член B описывает вклад продольной молекулярной диффузии; член C характеризует сопротивление массопереносу.

Для открытых капиллярных колонок, которые не содержат насадки, член A равен нулю. В результате уравнение Ван-Деемтера принимает вид, известный как уравнение Голя [7]:

$$h = \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (1.18)$$

В уравнении Голя член B , характеризующий продольную диффузию, выражается следующим образом:

$$B = 2D_m \quad (1.19)$$

где D_m — коэффициент диффузии вещества в подвижной фазе.

Коэффициент диффузии в газовой фазе можно предсказать по молекулярным массам и объемам компонента и газа-носителя [8]. При хроматографировании всегда имеет место продольная диффузия. Она проявляется в том, что пик компонента расширяется, и тем больше, тем дальше компонент находится в колонке. Сопротивление массопереносу зависит от коэффициента емкости и отражает сопротивление массопереносу, которое зависит от коэффициента емкости и отражает сопротивление массопереносу из газовой фазы в НФ и из НФ в газовую фазу. Таким образом, член C включает две составляющие

$$C = C_m + C_s \quad (1.20)$$

Сопротивление массопереносу в газовой фазе (C_m) описывается следующим уравнением:

$$C_m = \frac{r^2}{D_m} \left(\frac{1 + 6k + 11k^2}{24(1+k)^2} \right) \quad (1.21)$$

Сопротивление массопереносу в жидкой фазе (C_s) описывается уравнением

$$C_s = \frac{d_f}{D_s} \left(\frac{2k^2}{4(1+k)^2} \right) \quad (1.22)$$

где D_s — коэффициент диффузии вещества в НФ. В случае капиллярных колонок со сравнительно тонкой пленкой НФ величиной C_s можно пренебречь.

Таким образом, эффективность разделения существенно зависит от геометрических размеров колонки, а также от физических свойств анализируемого вещества, подвижной и неподвижной фаз:

Для WCOT-колонок минимальная высота, эквивалентная теоретической тарелке, определяется по уравнению

$$h_{\min} = r \sqrt{\frac{1 + 6k + 11k^2}{3(1+k)^2}} \quad (1.23)$$

Величина $h_{\min}$ соответствует эффективности колонки, достигаемой при нанесении идеальной НФ в идеальных условиях. Эффективность нанесения НФ оценивают, сравнивая полученное значение h и $h_{\min}$, рассчитанное по уравнению (1.23).

Другой мерой оценки эффективности колонки является число разделений (Trennzahl, или TZ). Эта величина также нашла широкое применение в капиллярной хроматографии. Число разделений определяется как разрешение двух соседних членов гомологического ряда, различающихся одной CH_2 -группой, и рассчитывается по уравнению

$$TZ = \left(\frac{t_R(N+1) - t_{RN}}{W_h(N+1) + W_{hN}} \right) - 1 \quad (1.24)$$

Число разделений и величина разрешения R связаны между собой следующим образом:

$$TZ = R/1,777 - 1 \quad (1.25)$$

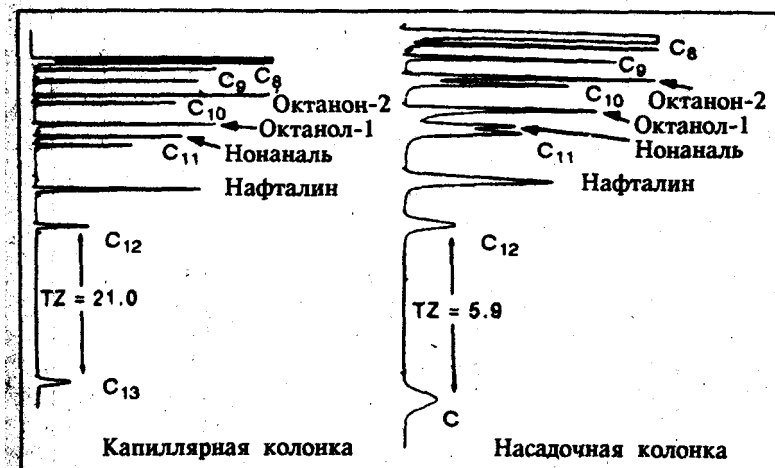


Рис. 1-4. Определение числа разделений в газовой хроматографии с капиллярными и насадочными колонками. Условия эксперимента: капиллярная колонка 4,5 x 10 мм, НФ — метилсиликон, газ-носитель — гелий 35 см/с; насадочная колонка 5,2 x 10 мм, сорбент 3% OV-101 на хромосорбе W-HP (100/200), газ-носитель — гелий, 30 мл/мин.

Другими словами, число разделений — это число пиков, которые могли бы быть разделены между двумя соседними гомологами. Эта величина называется также эффективным числом пиков. Расчет Числа разделений демонстрирует рис. 1-4. Как следует из приведенных данных, для капиллярной колонки число разделений между пиками нормальных углеводородов C_{12} и C_{13} более чем в 3 раза превышает число разделений, полученное в аналогичных условиях на насадочной колонке. Конкретно, на капиллярной колонке между пиками C_{12} и C_{13} может быть разделен 21 пик, а на насадочной — менее 6.

Преимущество величины TZ перед другими показателями эффективности состоит в том, что число разделений можно применять для характеристики системы в условиях программирования температуры. Кроме того, величина TZ связана с индексами удерживания Ковача (уравнение 1.9), Значение TZ для двух n -алканов рассчитывается по формуле

$$TZ = \left(\frac{100}{\Delta I} - 1 \right) \quad (1.26)$$

Следовательно, если для критической пары соединений известны индексы удерживания Ковача, то необходимое значение TZ можно рассчитать по уравнению (1.26). Например, для разделения двух компонентов с индексами удерживания 1270 и 1274 ($\Delta I = 4$) требуется колонка с $TZ = 24$. Таким образом, полностью разделить эти компоненты на капиллярной колонке в условиях, представленных на рис. 1-4, не удастся.

Селективность

В хроматографии под селективностью понимают селективные физико-химические взаимодействия между анализируемыми веществами и хроматографической системой. В газовой хроматографии селективность определяется природой НФ. Типы неподвижных фаз для газовой хроматографии подробно описаны в работах Бломберга [9], Хакена [10] и Старка и сотр. [11]. Обычно селективность НФ выражают через относительное удерживание критической пары компонентов пробы:

$$\alpha = \frac{t'_{R,j}}{t'_{R,i}} \quad (1-27)$$

где $t'_{R,j} > t'_{R,i}$. Значение фактора селективности выше 1 указывает на то, что может быть достигнуто разделение.

Взаимодействия анализируемого вещества и НФ представляют собой различные неполярные дисперсионные и специфические полярные взаимодействия. К последним относятся взаимодействия диполей и водородные связи. НФ обычно подразделяют на два класса в зависимости от их селективности — полярные и неполярные НФ. Однако понятия "полярность" и "селективность" не являются синонимами. Полярность — это только один из факторов, определяющих селективность. Полярность обуславливает взаимодействие НФ с полярными группами анализируемого вещества, Селективность НФ определяется комплексом взаимодействий анализируемых веществ и НФ.

Система для характеристики селективности НФ была предложена Мак-Рейнольдсом [12]. Согласно этой системе, селективность оценивается как разность индексов удерживания Ковача пяти выбранных стандартных соединений (бензол, n -бутанол, пентанон-2, нитропропан и пиридин), определенных на колонке с исследуемой НФ, и индексов удерживания тех же соединений, определенных на колонке со скваланом. Мак-Рейнольдс охарактеризовал таким образом более 200 НФ и предложил шкалу "полярности" НФ. Оказалось, что селективности многих НФ, используемых в газовой хроматографии с насадочными колонками, очень близки.

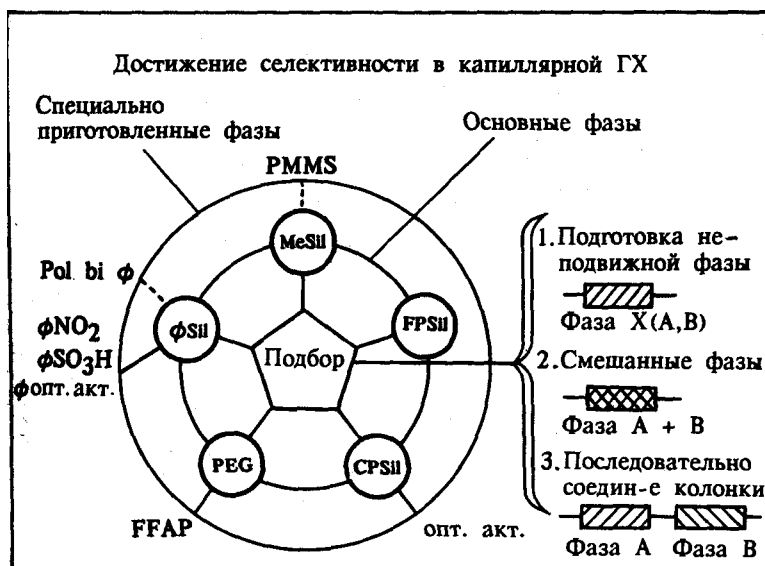


Рис. 1—5. Способы достижения специфической селективности в капиллярной газовой хроматографии [15] (с разрешения Huethig Verlag).

ϕ Sil - силиконовые фазы; MeSil — метилсиликоновые фазы; FPSil — трифторпропилметилсиликоновые фазы; CPSil — бицианопропилметилсиликоновые фазы; PEG — полиэтиленгликоли; FFAP — фазы на основе свободных жирных кислот; Pol bi ϕ — полидиметилсиликоновые фазы; опт. акт. — оптически активные фазы; ϕ NO₂, ϕ SO₃H, ϕ опт. акт. — нитро-, сульф- и оптически активные фазы на основе фенилметилсиликона.

Был предложен перечень наиболее предпочтительных фаз [13], что облегчает выбор НФ для исследователя.

Самыми распространенными НФ, используемыми для получения WCOT-колонок, являются метилсиликоновые (OV-1, SE-30), фенилметилсиликоновые (SE-54, OV-17), цианопропилметилсиликоновые (OV-225, OV-275), трифторпропилметилсиликоновые (OV-210) фазы, а также полиэтиленгликоли (карбовакс 20 М) [13]. Большинство высокоэффективных разделений в газовой хроматографии проводится с использованием этих фаз.

Однако в некоторых случаях для успешного разделения необходимы колонки с НФ, обладающими специфической селективностью (рис. 1-5). Такую селективность можно получить за счет использования: 1) специально приготовленных фаз; 2) колонок со смешанными фазами; 3) последовательно соединенных колонок с различными НФ.

Специальные фазы можно приготовить из основных НФ, применяемых в хроматографии. Например, обработка полиэтиленгликоля (ПЭГ) кислотой приводит к получению фазы с группами свободных жирных кислот, которая успешно применяется для разделения неэтерифицированных жирных кислот (FFAP).

Путем смешения определенных количеств двух различных фаз получают фазы, позволяющие оптимизировать разделение. Если эти фазы не смешиваются, синтезируют сополимер, который со держит определенные количества селективных функциональных групп от обеих фаз. Истинный состав смеси фаз или сополимер можно определить методом оконных диаграмм [14], если проведено разделение на индивидуальных фазах. Колонки со специфической селективностью нашли применение в исследованиях, направленных на определение летучих соединений в объектах окружающей среды. Вопросы получения колонок со специфической селективностью подробно рассмотрены в работе Сандры и сотр. [15].

Практическое приложение хроматографической теории

Разрешение и время, необходимое для проведения анализа, зависят от некоторых взаимосвязанных параметров колонки и условий проведения анализа. Основные факторы, влияющие на разделение, — это геометрические размеры колонки — длина и внутренний диаметр, тип НФ и толщина ее пленки в колонке, природа газа-носителя и его скорость, температура колонки. При выбора колонки и разработке методики анализа необходимо хорошо представлять себе и учитывать влияние этих факторов. Первые четыре из перечисленных факторов являются характеристиками колонки, их следует учитывать при выборе колонки для анализа. Остальные параметры относятся к условиям эксперимента и могут быть легко изменены.

На рис. 1-6 приведены данные, иллюстрирующие влияние вида газа-носителя на разделение. Эти данные можно наилучшим образом объяснить на основе уравнения Голя. На рис. 1-7 показаны кривые эффективности, полученные при использовании WCOT-колонок внутренним диаметром 0,25 мм и различных газов-носителей — азота, гелия и водорода. Следует отметить, что самая высокая эффективность (минимальная ВЭТТ) достигается при использовании азота. Однако эта максимальная эффективность наблюдается лишь в узком интервале малых линейных скоростей газа-носителя, причем по мере увеличения линейной

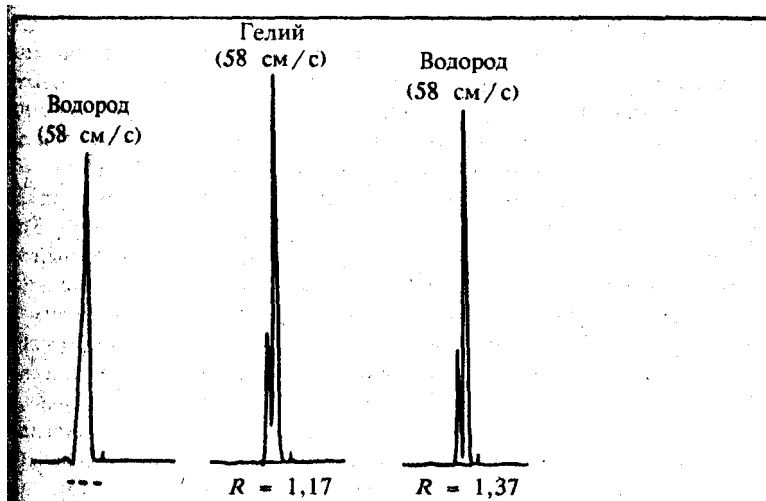


Рис. 1-6. Влияние природы газа-носителя на разделение н-гептадекана и пристана. Условия эксперимента: стеклянная WCOT-колонка 15 x 0,25 мм, НФ SE-52, изотермический режим (150°C).

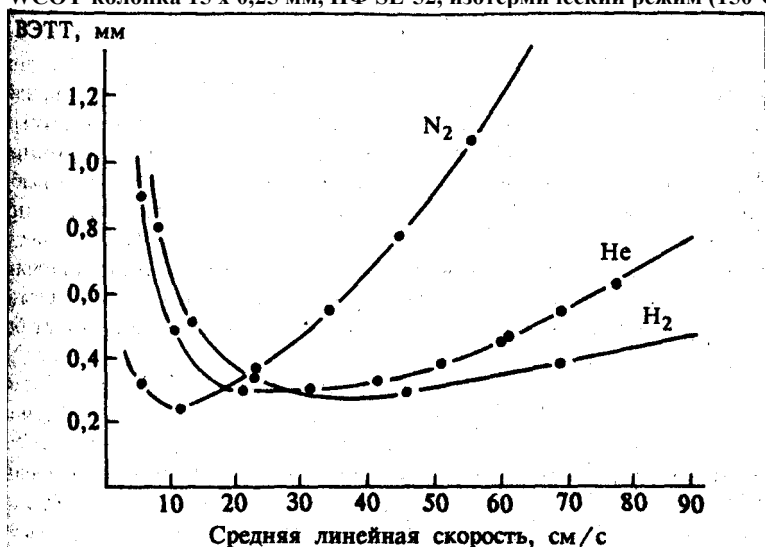


Рис. 1-7. Кривые эффективности при использовании различных газов-носителей. Условия эксперимента: WCOT-колонка 25 x 0,25, НФ OV-101 (толщина пленки НФ 0,4 мкм), определяемый компонент н-гептадекан, температура 175 °C.

скорости эффективность резко падает (пропорционально увеличению средней линейной скорости). Используя азот в качестве газа-носителя, для достижения оптимального разрешения приходится жертвовать скоростью. Именно поэтому азот редко применяют в капиллярной ГХ. Водород имеет меньшую вязкость, чем азот, поэтому изменение скорости газа-носителя не вызывает существенного изменения в разрешении. Область минимума на кривой эффективности для водорода существенно шире, причем минимальные значения ВЭТТ достигаются при более высоких скоростях. Все это и обуславливает выбор водорода в качестве газа-носителя в высокоэффективной газовой хроматографии.

Температура колонки очень сильно влияет на разделение. Логарифм коэффициента емкости (k) обратно пропорционален температуре. Чем ниже температура колонки, тем выше коэффициент емкости, т. е. больше продолжительность пребывания компонента в НФ (уравнение (1.5)). Увеличение продолжительности пребывания компонента в НФ позволяет более полно использовать ее селективность. Однако следует помнить, что при увеличении температуры селективность может изменяться и, следовательно, вероятно изменение последовательности элюирования компонентов из колонки.

Изменение толщины пленки НФ или внутреннего диаметра колонки влияет на фазовое отношение β и коэффициент емкости (см. уравнение (1.8)). Увеличение толщины пленки (или уменьшение фазового отношения) приводит к росту коэффициента емкости и, следовательно, к возрастанию удерживания и улучшению разделения. На рис. 1-8 показано разделение бензина, проведенное на капиллярных колонках с различной толщиной пленки НФ. Следует отметить, что при увеличении толщины пленки разрешение повышается, однако существенно возрастает продолжительность анализа.

Продолжительность анализа, определяемая как время удерживания последнего элюируемого пика, выражается следующим уравнением:

$$t_{R,x} = \frac{L}{\mu} (1 + k_x) \quad (1-28)$$

где k_x — коэффициент емкости последнего элюируемого пика.

Продолжительность анализа можно уменьшить, используя более короткие колонки, однако при этом снизится разрешение. Тем не менее это может и не быть серьезным недостатком, поскольку разрешения капиллярной колонки, как правило, более чем достаточно для удовлетворительного проведения анализа.

При проведении экспресс-анализов методом капиллярной газовой хроматографии используют колонки с внутренним диаметром, не превышающим 0,1 мм. В ряде работ [16-18] рассматриваются преимущества и недостатки WCOT-колонок малого

диаметра, применяемых в высокоскоростной газовой хроматографии. С учетом возможностей выпускаемого оборудования для проведения экспресс-анализа в большинстве, случаев пригодны колонки длиной 5-10 м и внутренним диаметром 100 мкм.

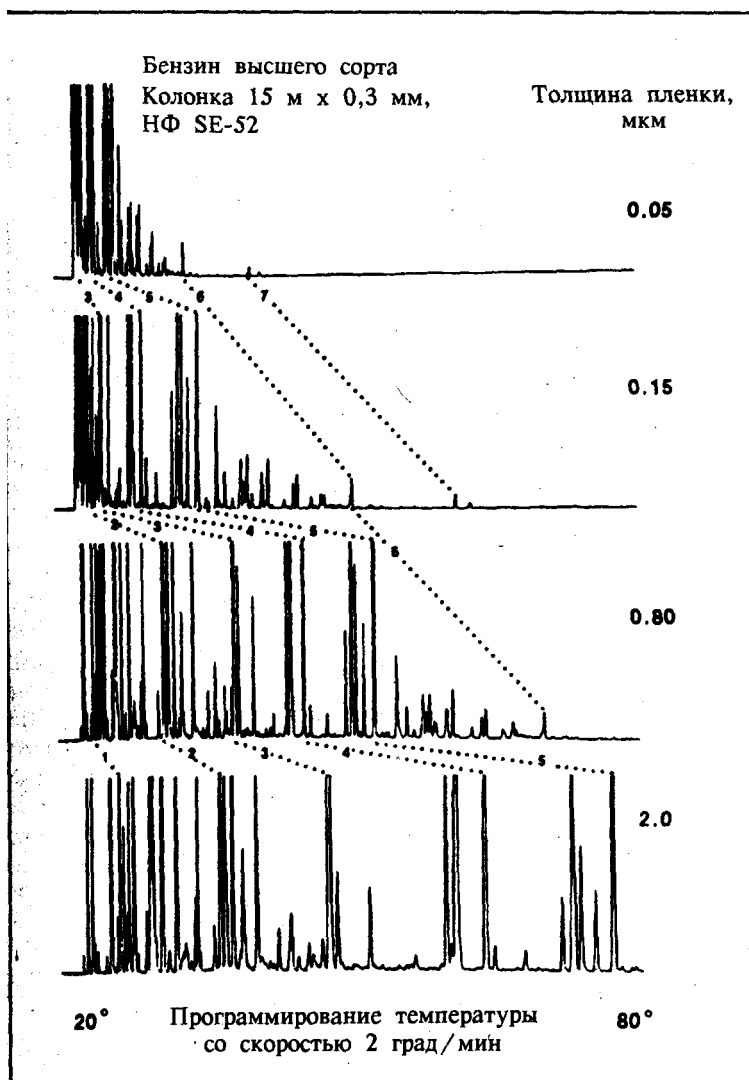


Рис. 1-8. Анализ бензина высшего сорта на капиллярных колонках с различной толщиной пленки НФ (K. Grab, G. Grob, HRC & CC, 2 (1979), 109, с разрешения Huethig Verlag).

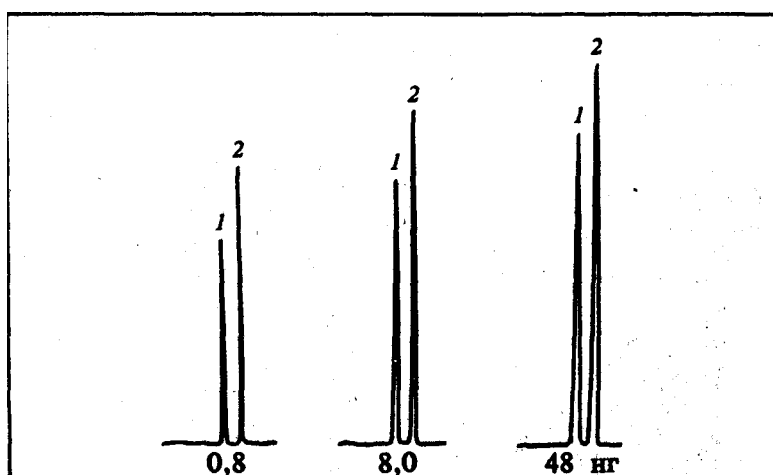


Рис. 1—9. Изменение формы пиков додекана (I) и м-пентадекана (II) при увеличении объема вводимой пробы. Условия анализа: кварцевая колонка 10 x 0,10 x 0,17 мм, смитая НФ 5% фенилметилсиликона, толщина пленки НФ 0,51 мкм. Емкость колонки, исчерпывается при концентрации каждого компонента 8 нг.

Наиболее серьезным ограничением при использовании капиллярных колонок малого диаметра является снижение емкости колонок по пробе. Емкость колонки определяет возможность определения высоких концентраций компонентов пробы. При превышении емкости колонки наблюдается ухудшение ее хроматографических характеристик. Превышение емкости колонки по пробе обычно называют перегрузкой. На хроматограмме перегрузка выражается в появлении широких асимметричных пиков, как показано на рис. 1-9 для случая разделения додекана и м-пентадекана (кварцевая капиллярная колонка диаметром 100 мкм, толщина слоя смитой НФ 5% фенилметилсиликона 0,17 мкм).

Рис. 1-10 иллюстрирует связь емкости колонки по пробе, толщины пленки НФ и фазового отношения. Представлена логарифмическая зависимость толщины пленки НФ от фазового отношения и емкости колонки для капиллярной колонки внутренним диаметром 250 мкм и с толщиной пленки НФ 1 мкм. Приведены кривые для выпускаемых промышленностью традиционных кварцевых WCOT-колонок внутренним диаметром 50-530 мкм. Путем Экстраполяции соответствующей кривой для определенного диаметра колонки и толщины пленки получают фазовое отношение и Относительную емкость по пробе. Например, емкость колонки внутренним диаметром 530 мкм и с толщиной пленки 3 мкм ($\beta = 45$) в 5,5 раз выше, чем для колонки внутренним диаметром 250 мкм. Таким образом, хроматографист может легко оценить изменение емкости по пробе при варьировании внутреннего диаметра для заданного фазового отношения или толщины пленки НФ

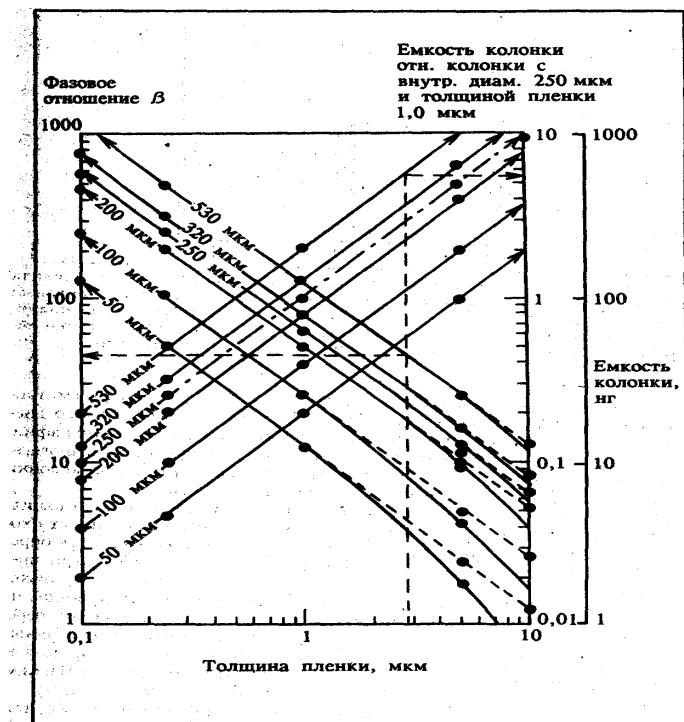


Рис. 1—10. Связь между толщиной пленки НФ, фазовым отношением и емкостью колонки по пробе (с разрешения D. C. Vellalanti, Shell Development Company, Houston, Texas).

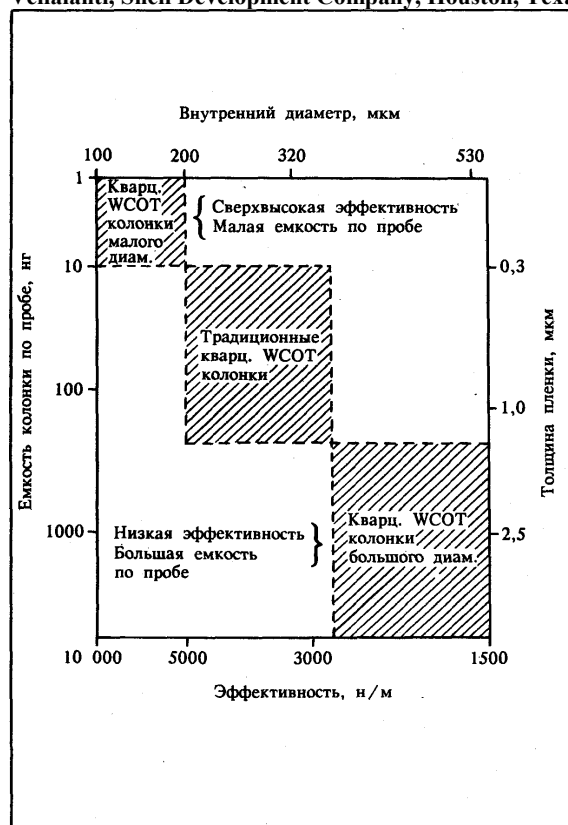


Рис. 1-11. Сравнение хроматографических параметров для используемых в настоящее время кварцевых WCOT-колонок.

При оптимизации хроматографического разделения полезно учитывать взаимосвязь эффективности разделения, продолжительности анализа, емкости по пробе и разрешения. Необходимо также принимать во внимание взаимное влияние параметров ко-

лонки и условий проведения анализа. Колонки малого диаметра (внутренний диаметр <0,2 мм) высокоэффективны и позволяют достигать высокого разрешения, однако их емкость по пробе мала. Широкие кварцевые WCOT-колонки (внутренний диаметр >0,53 мм) характеризуются невысоким разрешением, однако имеют существенно большую емкость по пробе. Эти колонки наилучшим образом подходят для проведения простых разделений, аналогичных тем, которые проводятся на насадочных колонках. На рис. Б11 проведено сравнение типов применяемых в настоящее время кварцевых капиллярных колонок и указаны диапазоны эффективности и емкости. Подробно вопросы, связанные с селективностью колонок, обсуждаются в гл. 2. Тем не менее рис. 1-11 можно использовать для выбора типа колонок при разработке аналитического метода, основанного на применении капиллярной газовой хроматографии.

Литература

1. Wainwright M. S., Haken J. K., Srisukh D. 1979. J. Chromatogr., 179, 160-166.
2. Parcher J. F., Johnson D. M. 1980. J. Chromatogr. Sci., 18, 267-272.
3. Kovats E. 1966. Advances in Chromatography, J. C. Giddings, R. A. Keller, Eds., Marcel Dekker, New York, 1, 229-247.
4. Budahegyi M. V., Lombosi E. R., Lombosi T. S., Meszaros S. Y., Nyiredy S., Tarjan G., Timor I., Takacs J. M. 1983. J. Chromatogr., 271, 213-307.
5. Curvers J., Rijks J., Cramers C., Knauff K., Larson P. 1985. HRC & CC, 8, 607-610.
6. Ibid, 611-618.
7. Golay M. J. E. 1958. Gas Chromatography, V. J. Coates, H. J. Noebels, I. S. Fargerson, Eds., Academic Press, New York, pp. 1-13.
8. Fuller E. N., Schettler P. D., Gidding J. C. 1966. Ind. Eng. Chem., 58 (5), 19-27.
9. Blomberg L. 1982. HRC & CC 5, 520-533.
10. Haken J. K. 1984. J. Chromatogr., 300, 1-77.
11. Stark T. J., Larson P. A., Dandeneau R. D. 1983. J. Chromatogr., 279, 31-40.
12. McReynolds W. O. 1970. J. Chromatogr. Sci., 8, 685-691.
13. Hawkes S., Grossman D., Hartkopf A., Isenhow T., Leary J., Parcher J., Wold S., Vancey J. 1975. J. Chromatogr. Sci., 13, 115-117.
14. Laub R. J., Purnell J. H. 1976. Anal. Chem., 48, 799-803.
15. Sandra P., David F., Proot M., Dirickt G., Veretappe M., Verzele M. 1985. HRC & CC, 8, 782-798.
16. Van Efa., Janssen J., Batty R., Cramers C., Rijkf J. 1987. HRC & CC, 10, 273-279.
17. Sandra P. 1987. LC-GC, 5, 236-246.
18. Hyver K. J., Phillips R. J. 1987. J. Chromatogr., 399, 33-46.

Капиллярная колонка

Б. Ньютон

Колонку часто называют сердцем хроматографической системы. Глубокий анализ роли колонки упростит многие проблемы современной капиллярной газовой хроматографии. В этой главе колонки, применяемые в высокоэффективной газовой хроматографии, рассмотрены с точки зрения их практического использования. Большинство работ в капиллярной газовой хроматографии выполнено на кварцевых капиллярных колонках, поэтому обсуждаются именно такие колонки.

В конце 70-х годов стеклянные колонки были хорошо известны, однако использовались они сравнительно редко. Именно тогда фирма Хьюлетт-Паккард начала свои исследования в этой области. Импульс разработке кварцевых капиллярных колонок придали исследования в области волоконной оптики. В 1979 г. на Международном симпозиуме по капиллярной хроматографии (Хинделенг, ФРГ) Р. Дандено представил сообщение об исследованиях, проведенных на колонках из кварца [1]. В сообщении говорилось о том, что ни один из опробованных материалов колонки не может превзойти плавленный кварц и что кварц представляет собой новый стандарт в хроматографии и прост в применении благодаря высокой гибкости материала.

Появление на рынке в конце 1979 г. кварцевых капиллярных колонок по существу явилось главным прорывом в области капиллярной газовой хроматографии. В 1979 г. менее 10% выпускаемых промышленностью хроматографов были приспособлены для работы с капиллярными колонками, а в 1989 г. их число превысило 60%. Можно ожидать, что число таких приборов будет расти, поскольку в результате развития метода появилась возможность анализа как высококипящих, так и легколетучих соединений.

Получение капилляров для кварцевых колонок

Установка для вытягивания капилляров

Схема стандартной установки для вытягивания капилляров [2-4] представлена на рис. 2-1. Исходная заготовка поступает в

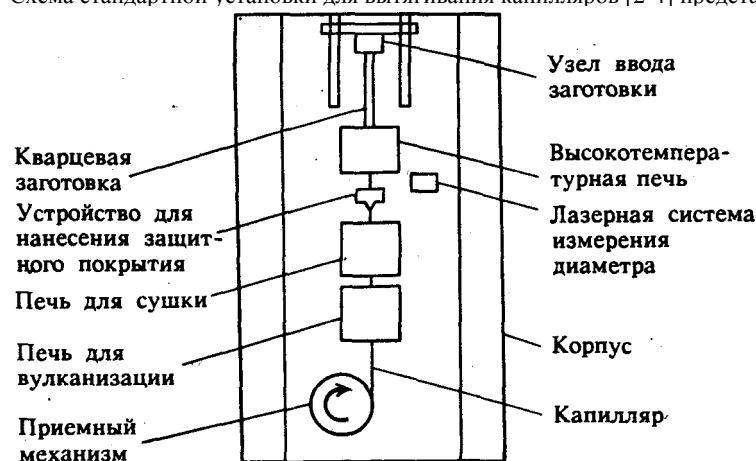


Рис. 2-1. Схема стандартной установки для вытягивания капилляра.

высокотемпературную печь (~ 2000°C). Кварцевый капилляр вытягивают при строгом контроле величины внутреннего и внешнего диаметра. Затем на капилляр наносится защитное покрытие. Опробовано большое количество самых разнообразных защитных материалов — от полиимида до золота. По сей день наиболее распространены покрытия из полиимида. На рис. 2-2 показаны капилляры с внешним защитным покрытием из полиимида и алюминия.

Прочность кварцевых капилляров

Хотя многие типы стекол пригодны в качестве исходного материала для получения гибких и прочных капилляров, но только синтетический плавленный кварц позволяет получить колонки с инертностью, необходимой для анализа таких веществ, как лекарственные препараты, пестициды, кислоты и амины [5,6].

Промышленностью выпускаются также капилляры из природного кварца, однако содержание оксидов металлов в нем слишком высоко для большинства приложений в хроматографии [7]. В синтетическом плавленном кварце содержание оксидов металлов мало ($< 1 \cdot 10^{-4}\%$), но на поверхности все же присутствуют силнольные группы, что обуславливает остаточную активность колонки. В ряде работ [8-23] предложены способы ликвидации этих активных центров или их блокировки. Процесс удаления активных центров называется дезактивацией.

Остаточная активность колонки влияет на результат хроматографического разделения. По инертности колонки сильно различаются. Методики испытаний не всегда позволяют оценить потенциальную активность колонки по отношению к разнообразным веществам, которые могут присутствовать в пробе. На рис. 2-3 представлены хроматограммы различных тестовых смесей, используемых для оценки инертности колонок.

При вытягивании гибкие капилляры, естественно, получаются прямыми; чтобы установить их в термостат обычного газового хроматографа, их необходимо свернуть в спираль. Для удерживания колонки ее наматывают на специальный каркас. Общая нагрузка на колонку зависит от диаметра каркаса и внутреннего диаметра капилляра (рис. 2-4). Чем меньше диаметр рамки для колонки, тем больше нагрузка и тем выше вероятность образования трещин и изломов. Колонки большого диаметра особенно

подвержены повреждениям в напряженном состоянии. Чтобы уменьшить образование трещин, следует проводить специальные испытания.



Рис. 2—2. Фотография кварцевых капиллярных колонок с защитным покрытием из полиимида и алюминия.

Кварцевые капиллярные колонки, на которые не нанесен защитный слой, подвержены действию влаги воздуха. Молекулы воды действуют на связи кремний — кислород с образованием силанольных групп. При этом образуются трещинки, которые разрастаются и через сравнительно небольшое время приводят к ломке капилляра (рис. 2-5). Внешнюю поверхность капиллярной колонки необходимо защищать от царапин и действия влаги, поэтому колонки покрывают защитным слоем полиимида или другого материала, не уступающего ему по прочности.

Тестовая смесь Ultra	Тестовая смесь Ultra	Тестовая смесь Brand X
Колонка Ultra 1	Колонка Brand X	Колонка Brand X

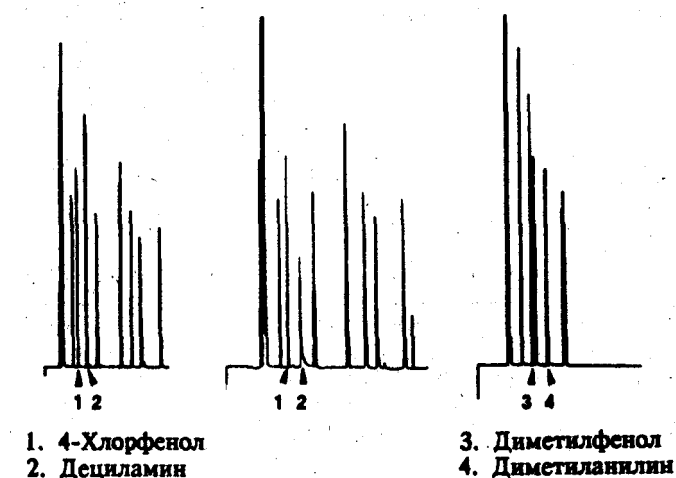


Рис. 2-3. Оценка инертности колонок с использованием различных тестовых смесей.

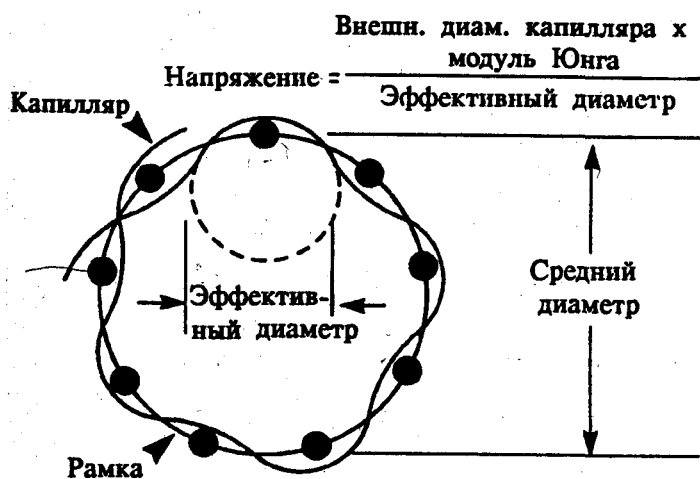
Типы капиллярных колонок

Для того чтобы правильно использовать капиллярные колонки, необходимо прежде всего разобраться в терминологии. По-видимому, самыми важными понятиями являются емкость колонки по пробе, разрешение, эффективность и селективность. Теория капиллярной газовой хроматографии и ее практические следствия рассмотрены в гл. 1. При выборе подходящей колонки для проведения анализа необходимо понимать, что означают эти характеристики и как они взаимосвязаны.

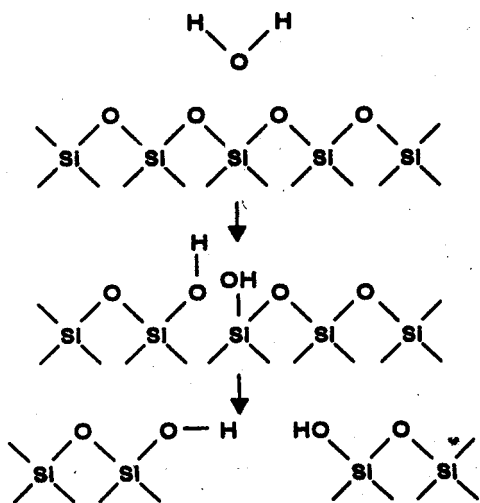
WCOT-, PLOT-, SCOT- и микронасадочные колонки¹

В настоящее время открытые капиллярные колонки, в которых тонкая пленка неподвижной фазы нанесена непосредственно на внутреннюю поверхность колонки (WCOT-колонки), используются наиболее часто. Однако последние достижения в области открытых капиллярных колонок с твердым пористым слоем носителя, нанесенным на стенки колонки (PLOT-колонки), возможно, приведут к тому, что эти колонки станут более популярными.

¹В русскоязычной научной литературе используются обычно следующие сокращения (см., например, К. Тесаржик, К. Комарек. Капиллярные колонки в газовой хроматографии. М.: Мир, 1987): ОКК — открытые (незаполненные) капиллярные колонки (WCOT); ОКК-ПС — открытые капиллярные колонки с пористым слоем (PLOT); ОКК-ТН — открытые капиллярные колонки с твердым носителем (SCOT). — Прим. ред.



2—4. Образование напряжения на капилляре при его наматывании на рамку.



2—5. Статическая усталость плавленого кварца.



Рис. 2-6. Электронная микрофотография кварцевой WCOT-колонки.

Выпускаемые промышленностью капиллярные WCOT-колонки имеют внутренний диаметр от 0,05 до 0,53 мм. Слой неподвижной фазы (НФ) толщиной от 0,1 до 0,8 мкм равномерно покрывает внутреннюю поверхность колонки (рис. 2-6). В качестве НФ используют полимеры, представляющие собой невязкую жидкость (OV-225), каучуки (OV-1, SB-30) или твердые вещества (карбонакс 20 М, суперокс). Эти фазы растворяют в соответствующих растворителях и наносят на внутреннюю поверхность капилляра. Существуют различные способы нанесения НФ. Чаще всего используют динамический и статический методы; в ряде работ [24-37] исследуются сверхдинамический метод и метод, основанный на нанесении фазы в условиях сверхкритической жидкости. После нанесения НФ можно провести сшивание или прививку фазы.

WCOT-колонки обладают высокой эффективностью по отношению к различным трудноразделяемым смесям,

состоящим из большого числа компонентов. Однако стандартная толщина пленки НФ не позволяет достичь достаточно высокой емкости колонки, необходимой при анализе концентрированных растворов. На этих колонках также нельзя провести эффективное разделение соединений с очень низкой молекулярной массой или инертных газов при обычных температурах. Чтобы преодолеть эти ограничения, были предложены WCOT-колонки с очень толстым слоем НФ [38-40]. Для решения этих задач можно также использовать PLOT-, SCOT- и микронасадочные колонки.

PLOT-колонки — это кварцевые капиллярные колонки, на внутренние стенки которых нанесен слой адсорбента (рис. 2-7). В настоящее время в качестве адсорбента используют Al_2O_3/KCl , молекулярные сита или пористые полимеры (близкие по составу к порпаку Q). В работах де Зеюва и де Нийса [41, 42] прекрасно изложены вопросы теории и изготовления этих колонок и приведены примеры их практического использования. К недостаткам этих колонок отнести меньшую эффективность по сравнению с WCOT-колонами, невысокую инертность и снижение стабильности и воспроизводимости во времени.

SCOT-колонки — капиллярные колонки, на внутренних стенках которых нанесен слой носителя с НФ, — реже используются в высокоэффективной ГХ из-за низкой инертности носителя. В SCOT-колонах НФ наносится на твердый носитель, прикрепленный к стенке колонки. Основным достоинством колонок этого типа является возможность применения широкого ассортимента НФ. Многие специалисты, работающие в области высокоэффективной газовой хроматографии, считают, что для достижения высокой эффективности не требуется большого количества различных фаз, а можно обойтись ограниченным набором. Поэтому для внедрения SCOT-колонок в хроматографическую практику необходимо показать их перспективность.

Микронасадочные капиллярные колонки — это капиллярные колонки, практически целиком заполненные носителем [43-46]. В будущем микронасадочные и SCOT-колонки, вероятно, найдут большее применение для проведения некоторых анализов, но их широкое использование в настоящее время выглядит проблематично.

Таблица 2—1. Традиционные НФ, используемые в WCOT-колонах

Состав	Полярность	Определение вещества	Фазы с близкими константами Мак-Рейнольдса	Диапазон температур, °C
1. 100% диметилполисилоксан (каучук)	Неполярная	Фенолы, углеводороды, амины, серосодержащие соединения, пестициды, полихлорированные бензолы	OV-1, SE-30	-60-325
2. 100% диметилполисилоксан (вязкая жидкость)	»	Производные аминокислот, эфирные масла	OV-101, SP-2100	0-280
3. 5% дифенил, 95% диметилполисилоксан	»	Жирные кислоты, метиловые сложные эфиры, алкалоиды, лекарственные препараты, галогенсодержащие соединения	SE-52, OV-23, SE-54	60-325
4. 14% цианопропилфенилполисилоксан	Средняя	Лекарственные средства, стероиды, пестициды	OV-1701	-20-280
5. 50% фенил, 50% метилполисилоксан	»	Лекарственные средства, стероиды, пестициды, глицколи	OV-17	60-240
6. 50% цианопропилметил, 50% фенил	«	Жирные кислоты, метиловые сложные эфиры, ацетаты алдитола	OV-225	60-240
7. 50% трифторпропилполисилоксан	«	Галогенсодержащие соединения + ароматические соединения	OV-210	45-240
8. ПЭГ, модифицированный терефталевой кислотой	Полярная	Кислоты, спирты, альдегиды, акрилаты, нитрилы, кетоны	OV-161, SP-2100	60-240
9. ПЭГ	«	Свободные кислоты, спирты, простые эфиры, эфирные масла, глицколи, растворители	Карбовакс 20 М	60-220

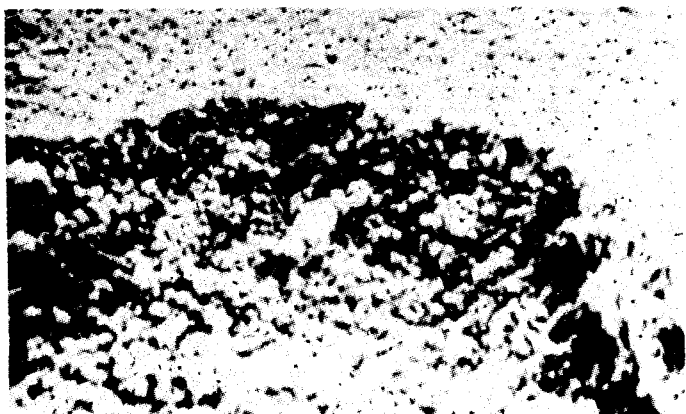


Рис. 2-7. Электронная микрофотография адсорбента, используемого в PLOT-колонках (с разрешения Chrompack International, Нидерланды).

Типы неподвижных фаз (поперечно-сшитые и привитые) и их устойчивость

В настоящее время промышленностью выпускается 9 основных типов жидких фаз, наиболее часто используемых в WCOT-колонках. Кроме того, фирмы — производители фаз выпускают в широком ассортименте специально приготовленные фазы для проведения определенных разделений. В табл. 2-1 перечислены стандартные НФ и приведены их хроматографические характеристики.

Благодаря тому что ассортимент выпускаемых НФ сравнительно невелик, а в последние 5 лет опубликовано большое число работ, посвященных применению этих фаз, выбор нужной фазы стал сравнительно простым делом. Для получения качественных кварцевых капиллярных колонок необходимо, чтобы унос фазы из колонки был низким. Многие фирмы, специализирующиеся на выпуске капиллярных колонок, сами выпускают НФ для нанесения их на колонку. Эти фазы позволяют получать высокоэффективные колонки, характеризующиеся низким испарением НФ из колонки. Однако результаты анализов, проведенных с использованием аналогичных НФ, выпускаемых разными фирмами, могут и не совпадать. Это становится более очевидным при рассмотрении полярных фаз. Ситуация может еще более усложниться, если учесть различные методы производства колонок [79]. Различия в этих фазах проявляются чаще всего в изменении степени инертности к некоторым классам соединений (например, спиртам, кислотам, аминам) и положения пика на хроматограмме (изменение времени или индекса удерживания) [80] (рис. 2-8).

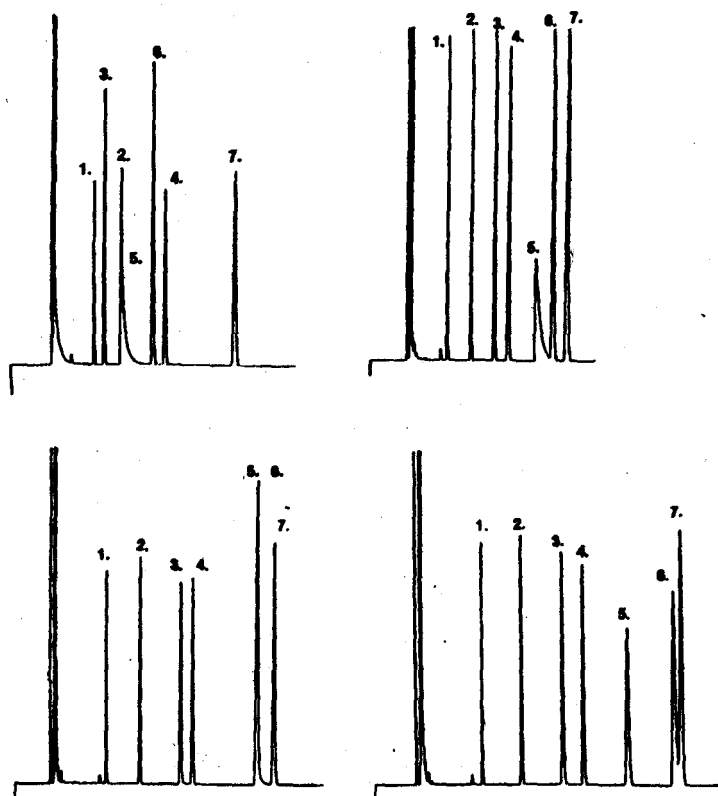


Рис. 2-8. Сравнение хроматограмм стандартной смеси, полученных на 4 колонках со сшитой фазой карбовакс 20 М. Использовали 4 образца карбовакс 20 М, выпускаемого разными фирмами-производителями.

1 — тетрадекан; 2 — пентадекан; 3 — н-октано́л; 4 — гексадекан; 5 — масляная кислота; 6 — дициклогексилламин; 7 — гептадекан.

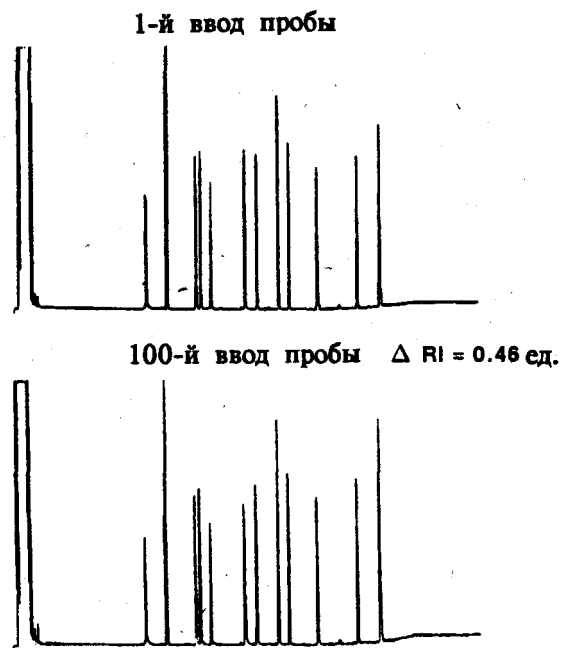


Рис. 2-9. Сравнение хроматограмм, полученных после первого и сотого непосредственного ввода в колонку пробы, растворенной в метаноле.

Хотя изменение положения пика может быть небольшим (5-10 единиц индекса удерживания), для потребителя, проводящего химическую идентификацию методом ГХ, последствия этого могут быть катастрофическими. Эта проблема хорошо известна, поэтому во многих методиках ГХ указывается не только тип колонки, но и производитель НФ. К сожалению, указание производителя фазы не гарантирует того, что удастся воспроизвести описанную методику. Это объясняется тем, что незначительное изменение условий получения колонок влияет на воспроизводимость последних. Разделение, осуществленное на "лучшей" колонке из партии, может и не воспроизвестись на "худшей" колонке.

В предыдущей главе указывалось, что для проведения некоторых разделений могут быть приготовлены специальные фазы. Они могут представлять собой смесь двух или более стандартных фаз или фазу с определенными свойствами, синтезированную специально для проведения того или иного анализа. Небольшое изменение химического состава жидкой фазы может принципиально изменить результат разделения, поэтому перед тем, как использовать фазу в хроматографии, ее надо охарактеризовать самым тщательным образом. В настоящее время для характеристики фазы используют следующие методы:

Метод	Получаемая информация
Гель-проникающая хроматография	Распределение по молекулярной массе [81]
Спектрофотометрия в УФ и видимой области спектра	Содержание фенильных групп
Термический гравиметрический анализ	Термическая устойчивость фазы
ИК-спектроскопия	Наличие определенных функциональных групп (например, цианогруппы)
ЯМР-спектроскопия	Расположение химических функциональных групп в молекуле фазы
Хромато-масс-спектрометрия	Замещение функциональных групп [82]

До сих пор в том, что касается НФ для газовой хроматографии, нет единого мнения о различиях между сшитыми (поперечно-сшитыми) и привитыми фазами. Каковы в точности преимущества того или иного вида обработки? При проведении большинства разделений необходимо, чтобы фаза была устойчива к действию вводимого растворителя и температуры в течение определенного срока работы [83]. На рис. 2-9 проведено сравнение хроматограмм, полученных при непосредственном вводе в колонку растворенной в метаноле пробы. Первая хроматограмма получена после одного ввода пробы, вторая — после ста вводов. Полученные данные свидетельствуют о стабильной работе колонки: после ста вводов времена удерживания компонентов пробы не изменились, а полученные пики симметричны. Качество колонки гарантирует надежную работу в экстремальных условиях.

Для достижения стабильной работы колонки в экстремальных условиях требуется иммобилизация НФ (путем поперечной сшивки и/или прививки). Поперечная сшивка — это реакция, которая приводит к связыванию отдельных групп полимерной фазы друг с другом с образованием более устойчивой макромолекулярной пленки. Прививка — это процесс химического прикрепления НФ к поверхности кварцевого капилляра. К настоящему времени опубликовано много работ, в которых показано, что сшитые фазы более долговечны и обладают большей термической устойчивостью по сравнению с несшитыми. Поперечная сшивка (вулканизация, иммобилизация) НФ достигается под действием инициаторов — свободных радикалов. Для иницирования сшивки используют пероксиды [84-86], озон [87], гамма-излучение [88-94] и азосоединения [95]. Для того чтобы процесс получения колонок был воспроизводим, необходимо выбрать оптимальный режим иницирования. Схема типичной реакции поперечной сшивки представлена на рис. 2-10.

Сшивка более полярных фаз затруднена, поэтому фирмы-производители выпускают как сшитые, так и несшитые фазы. Колонки со сшитыми фазами можно промывать растворителем с целью регенерации; колонки же с несшитыми фазами промывать нельзя. Поэтому, прежде чем промывать колонку растворителем, следует убедиться в том, что тип колонки позволяет это сделать.

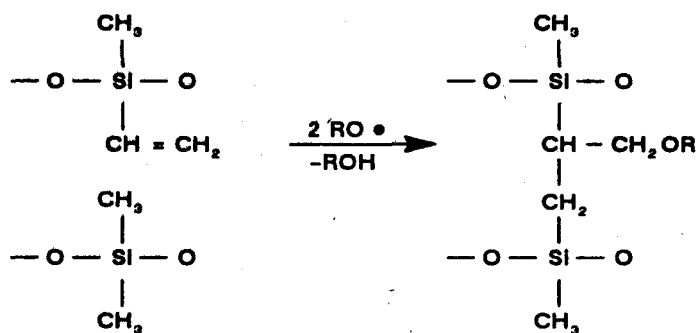


Рис. 2-10. Типичный механизм реакции поперечной сшивки.

Эффективность нанесения фазы определяется в процентах от теоретически возможной. Обычно эффективность нанесения для неполярных силиконовых и более полярных фаз равна соответственно 90-100 и 60-80%. Эффективность нанесения — это мера однородности нанесения НФ на стенки кварцевой колонки. Чем выше однородность, тем больше общее число теоретических колонок для данной колонки. Полярные фазы не так хорошо "смачивают" поверхность кварца, как неполярные силиконовые фазы, поэтому общее число тарелок на длину колонки в этом случае ниже (см. табл. 2-2). Общая эффективность колонки связана также с ее внутренним диаметром. При увеличении внутреннего диаметра колонки снижается эффективность нанесения и резко уменьшается общее число теоретических тарелок.

Таблица 2—2. Сравнение средней эффективности колонок с различными внутренним диаметром и типом фаз. Приведены число тарелок/м и эффективность нанесения, %

Внутренний Диаметр, мм	Метилсиликоновая фаза (неполярная)	Фаза, содержащая 50% фенильных групп (средней полярности)	Карбовакс 20 М (полярная)
0,1	10000/90%	—	
0,2	4500/90%	4200/80%	4000/70%
0,32	3200/90%	3000/80%	2500/70%
0,53	1500/75%	1350/60%	1300/60%

Некоторая общая информация об устойчивости фаз как при высокой, так и при низкой температуре представлена в табл. 2.1. Как правило, сшитые фазы устойчивы к действию температуры, поэтому их можно нагревать или охлаждать в более широком интервале температуры, чем аналогичные несшитые фазы. Унос фазы из колонки при высокой температуре зависит от термического разложения. В настоящее время за счет кондиционирования и сшивки стандартных фаз удается уменьшить унос фазы из колонки в единицу времени, однако полностью избежать его не представляется возможным. Следовательно, для уменьшения уноса фазы из колонки при высокой температуре следует снизить объем фазы внутри колонки. Это означает, что для работы при высокой температуре наиболее пригодны колонки с тонкой пленкой НФ (0,1 мкм и меньше). Другое ограничение для повышения температуры связано с полиимидным покрытием колонок. При постоянной эксплуатации при температуре выше 380°C полиимидное покрытие стабильно только в течение нескольких суток. Недавно было предложено решение этой проблемы: в качестве защитного покрытия использовали алюминий [96-98]. На рис. 2-11 приведены примеры использования таких колонок.

Выбор колонки

При выборе колонки чаще всего поступают следующим образом:

- Испытывают имеющуюся в распоряжении колонку.
- Обращаются за советом к коллегам.
- Проводят литературный поиск.

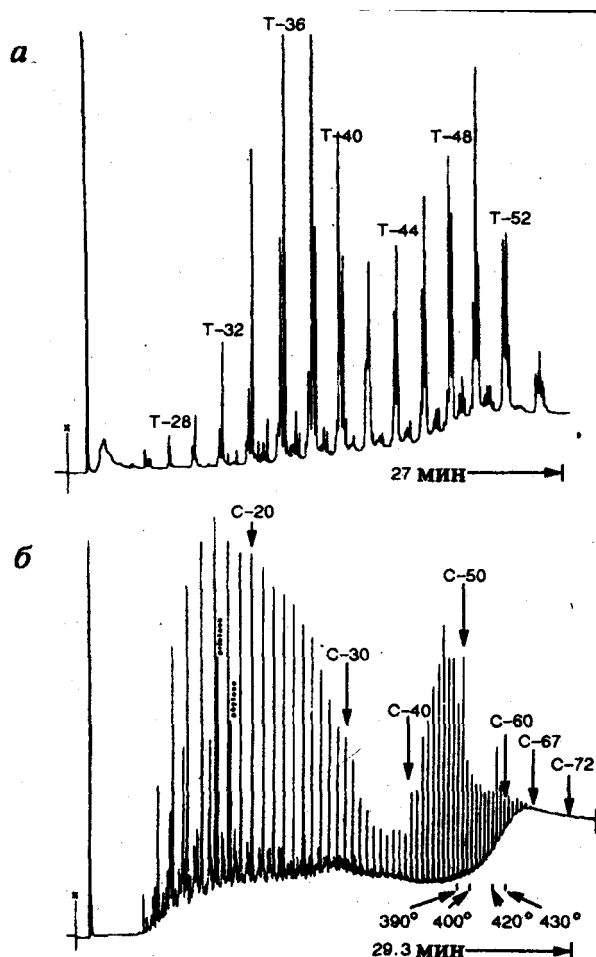


Рис. 2-11. Примеры использования высокотемпературной газовой хроматографии на кварцевых капиллярных колонках с алюминиевым покрытием.

а — определение триглицеридов в масле; б — анализ канадской сырой нефти (с разрешения Quadrex Corporation).

Такой подход является проверенным и надежным, однако он, лишен преимуществ с точки зрения оптимизации хроматографического разделения. Другими словами, пользователь может в конце концов найти правильное решение, однако оно не обязательно будет оптимальным в том, что касается качества разделения, скорости анализа и, возможно, срока службы колонки. Безусловно, всегда приходится с чего-то начинать, и такой подход вполне пригоден в качестве первого этапа, однако на этом не следует останавливаться. Для оптимизации хроматографического разделения проводят тщательный анализ полученных результатов и следуют нескольким проверенным практикой правилам:

Проблема:	Пики анализируемых компонентов не разрешены (нет разделения).
Решение:	Выбрать более длинную колонку или колонку с меньшим внутренним диаметром. При этом увеличивается селективность. Если использовалась колонка максимально возможной длины или минимально возможного диаметра, единственным решением является замена фазы, что позволит изменить селективность.
Проблема:	Слишком хорошее разрешение (признак неопытности исследователя).
Решение:	Выбрать колонку меньшей длины или большего внутреннего диаметра или колонку с менее толстой пленкой НФ. Оптимизация анализа необходима, поскольку в противном случае продолжительность анализа будет неоправданно велика. Помните о том, что основным достоинством кварцевых капиллярных колонок является возможность их разрезания на отрезки любой длины.
Проблема:	Плохая форма пика.
Решение:	Если колонка установлена правильно и прибор исправен, то плохая форма пика может быть обусловлена одной из перечисленных ниже причин или их совокупностью: 1) Компонент пробы не сочетается с неподвижной фазой колонки. Попробуйте использовать другую фазу. Помните, что "подобное растворяется в подобном". Поэтому для разделения полярных компонентов пробы следует использовать полярные фазы. 2) Колонка может быть предназначена для целей, отличных от решения вашей задачи. Следует связаться с поставщиком, изучить спецификацию для данной колонки и сделать вывод, подходит ли она в принципе для решения поставленной задачи. 3) Возможно, что концентрация компонентов пробы слишком велика и толщина пленки НФ недостаточна. Необходимо снизить нагрузку на колонку или перейти к более толстым пленкам НФ.
Проблема:	Чрезмерный унос фазы при высокой температуре.
Решение:	Использовать колонки с более тонкими пленками сшитой НФ. При выборе оптимальной колонки для разделения важно учитывать следующие характеристики колонки: • эффективность (число теоретических тарелок/м колонки) • значение коэффициента емкости k (мера воспроизводимости толщины пленки) • значение индексов удерживания (характеристика химической природы колонки) • значения высот пиков оснований/кислот (мера инертности колонки)

- унос фазы (мера термической стабильности колонки).

Имея эту информацию и поразмыслив немного, хроматографист может с уверенностью выбрать колонку, наилучшим образом отвечающую требованиям анализа.

Оценка работы колонки

В последнее десятилетие предложено большое количество стандартных смесей, используемых для оценки колонки [93-103]. На рис. 2-12 показано разделение двух таких полярных смесей. Использование тестовых смесей позволяет получить сведения о параметрах колонки, например об ее инертности, индексах удерживания, эффективности и т. д. [104]. В результате можно сделать общий вывод о качестве колонки. Для проведения оценки необходимы определенный набор стандартных соединений и указание условий проведения тестирования.

Однако, с точки зрения потребителя, условия проведения стандартных испытаний могут иметь лишь косвенное отношение к качеству колонки и сроку ее службы. Во-первых, анализируемая исследователем смесь может быть проще или сложнее стандартной смеси. Во-вторых, пользователь заинтересован в том, чтобы характеристики колонки оставались неизменными при 100-2000 вводах пробы. Поэтому стандартная смесь, используемая производителем колонок, совсем не обязательно совпадает с применяемой пользователем. Более того, эти смеси, возможно, не должны быть одинаковыми. Идеальная ситуация — создание стандартной смеси в лаборатории пользователя. Тогда пользователь получал бы информацию, наилучшим образом отвечающую его нуждам. Например, смесь, используемая в лаборатории охраны окружающей среды, содержала бы пестициды, а используемая в токсикологической лаборатории, — лекарственные препараты. Очень немногие производители колонок используют лекарственные препараты или пестициды в стандартных смесях, поэтому такое испытание по заказу даст потребителю лучшее представление о работе колонки. После того как определен состав соответствующей стандартной смеси, необходимо принять меры по сохранению этой смеси неизменной. Поскольку большинство стандартных смесей подвержено разложению, необходимо использовать только свежеприготовленные пробы с гарантией их качества. Разложившиеся компоненты пробы дадут неверные данные о работе колонки. Кроме того, неверные данные могут быть получены при плохой работе всей хроматографической системы и (или) неправильной установке колонки (рис. 2-13).

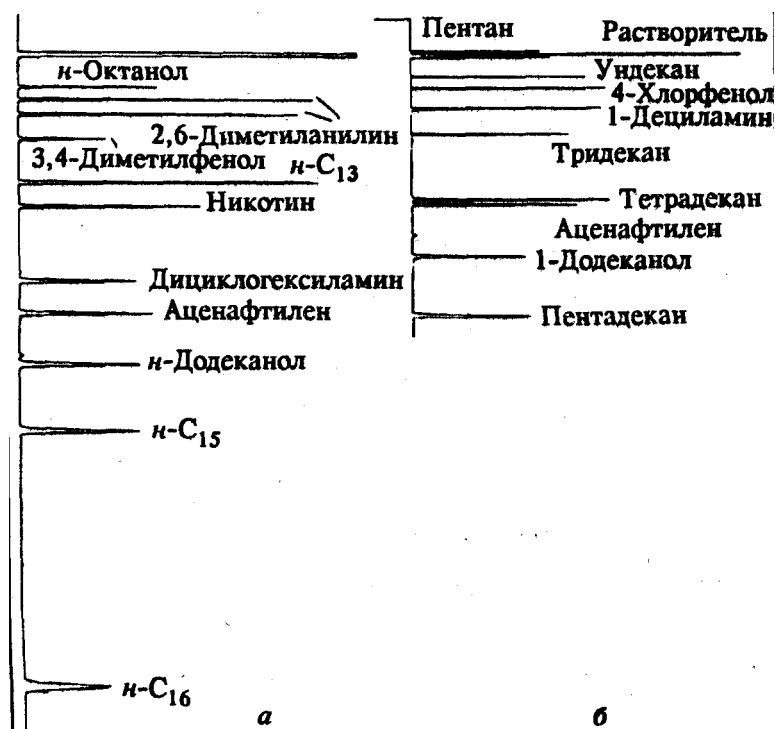
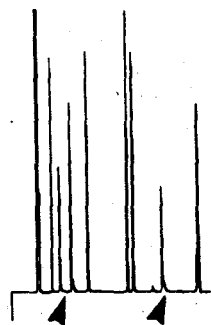


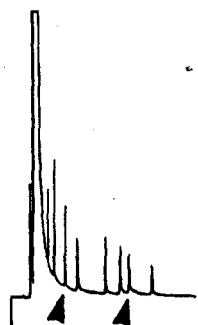
Рис. 2-12. Оценка работы кварцевых WCOT-колонок с использованием типичных стандартных смесей.

а — кварцевая капиллярная колонка 25 м X 0,2 мм, НФ SP-2100, изотермический режим (130°C), газ-носитель водород (32 см/с), хроматограф фирмы Hewlett-Packard, модель 5880А.

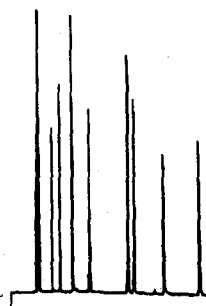
б — кварцевая капиллярная колонка 50 м X 0,32 мм, НФ OV-1, $\beta = 450$, изотермический режим (130°C), газ-носитель водород (27 см/с), хроматограф фирмы Hewlett-Packard, модель 5880 А.



Неправильное положение колонки относительно форсунки ПИД. Колонка недостаточно глубоко входит в форсунку



Неправильное положение колонки относительно узла ввода пробы. Колонка расположена недостаточно близко к отверстию ввода



Правильное положение колонки относительно ПИД и узла ввода пробы

Рис. 2-13. Сравнение работы хроматографической системы при правильной и неправильной установке колонки.

Как осуществлять контроль за работой колонки

1. Выбрать подходящую стандартную смесь
2. Обеспечить правильную работу газохроматографической системы
3. Периодически (еженедельно, ежемесячно) проводить анализ стандартной смеси
4. Собирать данные о работе колонки, а именно об
 - эффективности или разрешении;
 - инертности колонки (отношение высот пиков основания и кислоты);
 - индексах удерживания;
 - уносе фазы из колонки.

Многих проблем, возникающих ежедневно в хроматографической практике, можно избежать, если в лаборатории осуществляется качественный контроль состояния хроматографической системы, колонок, стандартных смесей. Ниже сведены самые важные показатели работы колонки.

- Эффективность
- Количество эффективных теоретических тарелок (изотермические условия)
- Разрешение
- Число разделений (режим программирования температуры)
- Активность
- Определение симметричности пика
- Изменение высоты пика (например, отношение высот пиков основания и кислоты)
- Воспроизводимость от колонки к колонке
- Изменение индекса удерживания
- Изменение k

Кондиционирование, эксплуатация и хранение колонок

Свеженанесенная неподвижная жидкая фаза содержит остаточные следовые количества растворителей, а также низкомолекулярные компоненты. Эти продукты проходят через колонку и регистрируются детектором как "унос фазы с колонки". В результате смещается нулевая линия и появляются посторонние пики, поэтому может потребоваться предварительное кондиционирование колонки. Кроме того, периодическое кондиционирование "старых" колонок целесообразно и потому, что в колонке накапливаются нелетучие компоненты, содержащиеся в пробе или газе-носителе.

Выбор температуры кондиционирования определяется рядом факторов и требует компромиссного решения. При высокой температуре кондиционирования нулевая линия стабильна, однако срок службы колонки сокращается. Менее высокие температуры кондиционирования способствуют продлению срока службы колонки, однако для получения стабильной нулевой линии требуется более длительное кондиционирование. При выборе температуры кондиционирования следует учитывать рабочие температуры и температурные пределы применимости нанесенной НФ. Если предполагается проводить анализ при температуре ниже 200°C, нет никакой необходимости проводить кондиционирование при температуре, превышающей 250°C. Вполне достаточно кондиционировать колонку в течение ночи при 220° и обычных объемных скоростях газа-носителя. Такое кондиционирование будет способствовать продлению срока службы колонки. Во избежание конденсации жидкой фазы и загрязнения детектора при кондиционировании рекомендуется отсоединять колонку от детектора. Перед тем как нагреть новую колонку до температуры выше 50°C, необходимо продуть ее в течение 5 мин чистым газом-носителем с обычной объемной скоростью. При этом из колонки удаляется адсорбированный кислород. Кроме того, необходимо убедиться в том, что газ-носитель проходит через колонку. Под действием высоких температур в отсутствие газа-носителя или при его малом расходе колонки быстро приходят в негодность. Важно, выяснить у поставщика колонок температурные пределы их использования, поскольку у разных фирм они различны. Когда жидкая фаза становится негодной, эффективность колонки резко падает. Часто при вводе пробы без делителя потока или при непосредственном вводе в колонку может произойти вытеснение жидкой фазы с первых 1-2 м колонки. В этом случае рекомендуется отрезать испорченную часть. Укороченную колонку можно продолжать использовать: уменьшение ее длины на 1-2 м не должно существенно повлиять на общую эффективность.

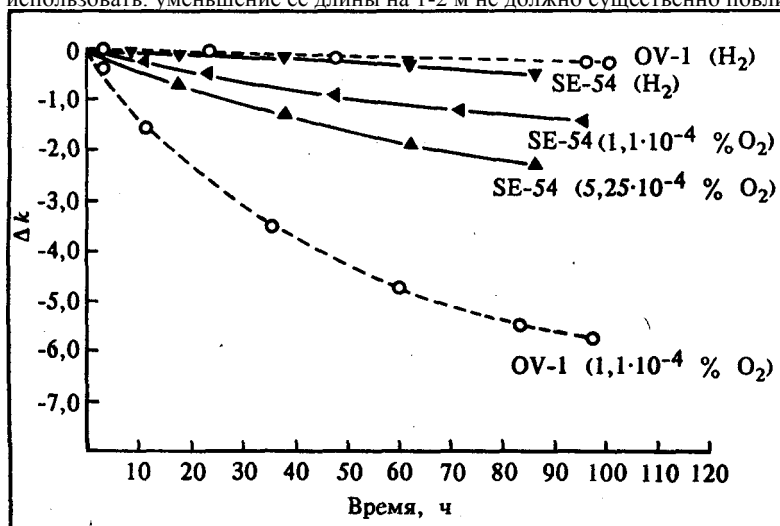


Рис. 2-14. Зависимость коэффициента емкости для пентадекана от давления при 325°C.

Недостаточная чистота газа-носителя и анализ проб, несовместимых с данной колонкой, могут существенно снизить срок службы последней. На качестве колонки также отрицательно сказываются окисление (рис. 2-14) и перегрев фазы (рис. 2-15) [105]. Силиконовые фазы устойчивы к действию воды (рис. 2-16), однако для них вредны кислотные пробы. Сшитая и несшитая фазы карбовакс 20М легко окисляются кислородом, содержащимся в газе-носителе. Кроме того, срок службы колонки с этой фазой может уменьшаться при анализе водных растворов проб. Отрицательно влияют на некоторые жидкие фазы такие растворители, как сероуглерод и диэтиловый эфир.

Если есть вероятность того, что качество колонки ухудшилось за счет накопления в ней нелетучих веществ, содержащихся в пробе, можно рекомендовать следующее:

- 1) Отрезать часть колонки (1-2 м) с той стороны, с которой вводится проба.
- 2) Перевернуть колонку и провести повторное кондиционирование в течение ночи.
- 3) Промыть колонку (рис. 2-17). Промывка колонки — это крайняя мера. Как правило, после промывки регенерируется только 50% колонок. Таким образом, используя этот метод, можно вообще потерять колонку.

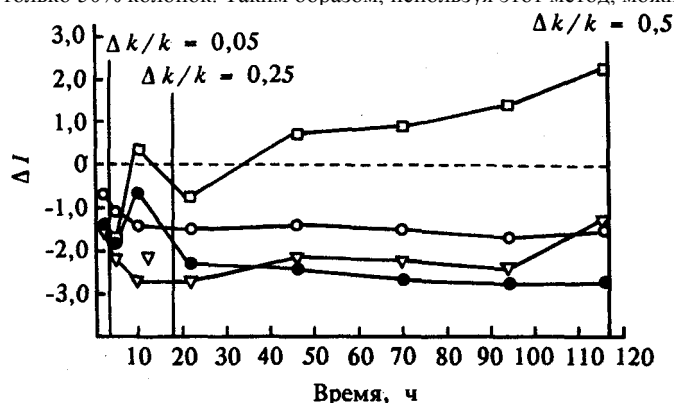


Рис. 2—15. Влияние температуры (400°C) на индексы удерживания (ΔI) для (V) аценафталина, (•) — н-дециламина; (O) — н-додеканоая, (D) — 4-хлорфенола.

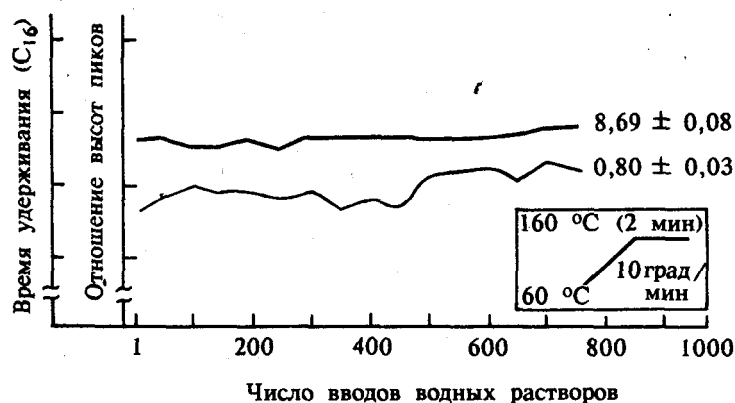


Рис. 2—16. Влияние введения воды (2 мкл/ввод) на время удерживания компонентов пробы и инертность колонки. Определено по соотношению высот пиков п-хлорфенола и м-дециламина для колонки со сшитой метилсиликоновой фазой.

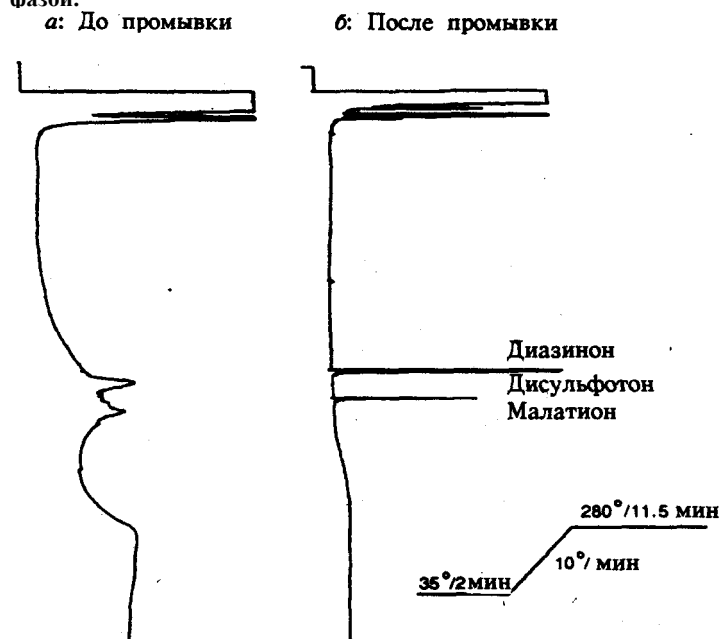


Рис. 2—17. Влияние промывки колонки на результаты анализа пестицидов.

а — хроматограмма экстракта пестицида после повторных вводов пробы непосредственно в колонку;
 б — хроматограмма, полученная после промывки колонки смесью метилхлорида и метанола (9:1). Колонка 25м x 0,32 мм, НФ-сшитая SE-54, $\beta = 450$ ($df = 0,11$ мкм), линейная скорость газа-носителя (He) 21 см/с. Температурный режим 35°C (2 мин). Программирование температуры до 280°C (10°C/мин), затем выдержка при 280* (11,5 мин).

Предложены и другие методы реставрации колонок [106,107], но с переменным успехом. Когда колонка не используется, ее необходимо хранить надлежащим образом. К хранению колонок предъявляются два основных требования:

1. Следует избегать повреждения колонок. Наличие небольшой царапины или трещины может привести к тому, что при нагревании колонка сломается в месте повреждения.
2. Необходимо герметично закрывать концы колонки, чтобы защитить жидкую фазу от попадания кислорода и загрязнения.

Работая с кварцевыми капиллярными колонками, необходимо помнить о мерах предосторожности при работе со стеклом, прежде всего защищать глаза от попадания осколков капилляра.

Тенденции в развитии капиллярных кварцевых колонок

В настоящее время наметились следующие тенденции в развитии капиллярных кварцевых колонок:

1. Использование более коротких колонок с меньшим внутренним диаметром. Такие колонки позволяют достичь чрезвычайно высокой-эффективности и проводить сверхскоростные определения.
2. Применение PLOT- колонок в капиллярной газодсорбционной хроматографии.
3. Использование высокотемпературных жидких фаз и внешних покрытий.
4. Внедрение смешанных или специально приготовленных фаз для проведения специфических разделений.

Внедрение этих разработок будет во многом зависеть от конструкционных модификаций существующего оборудования. Это касается как небольших изменений — разработки высокотемпературных термостатов и быстродействующей электроники, так и создания новых разновидностей оборудования и материалов, например миниатюрных хроматографических систем — микросхем [110] или микрокассет.

Зная сильные и слабые стороны кварцевых капиллярных колонок, можно по-разному относиться к ним: сомневаться в целесообразности их использования или, напротив, превозносить их. Как и в любой области науки, здесь справедлива пословица "Кто не рискует, тот не выигрывает".

Литература

1. Dandeneau R. D., Zerenner E. H. 1979. Proceedings of the Third International Symposium on Glass Capillary Chromatography, pp. 81-97. Hindelang.
2. Pretorius V., Desty D. H. 1982. *Chromatographia*, 15, 569-574.
3. Ryder B. L. 1983. The Manufacture of Fused Silica Tubing with Exceptional Durability. Pittsburgh Conference and Exposition.
4. Lipsky S. R., McMurray W. J., Hernandez M., Purcell J. E., Billeb K. A. 1980. *J. Chromatogr. Sci.*, 18, 1-9.
5. Oðan K. L., Reese C., Scott R. P. W. 1982. *J. Chromatogr. Sci.*, 20, 425-428.
6. Lipsky S. R. 1983. *HRC & CC*, 6, 359-365.
7. Lipsky S. R., McMurray W. J. 1981. *J. Chromatogr.*, 217, 3-17.
8. Stark T. J., Dandeneau R. D., Mering L. 1980. *The Role of the Deactivating Agent in the Preparation of Fused Silica Capillary Columns*. Pittsburgh Conference and Exposition.
9. Buijten J., Blomberg L., Markides K., Wannman T. 1982. *J. Chromatogr.*, 237, 465-468.
10. Woolley C. L., Markides K. E., Lee M. L., Bartle K. D. 1986. *HRC & CC*, 9, 506-514.
11. Kong R. C., Woolley C. L., Fields S. M., Lee M. L. 1984. *Chromatographia*, 18, 362-366.
12. Welsch T., Frank H. 1985. *HRC & CC*, 8, 709-714.
13. Markides K. E., Tarbet B. J., Schrengenberger C. M., Bradshaw J. S., Lee M. L., Bartle K. D. 1985. *HRC & CC*, 8, 741-747.
14. Rutten G., de Haan J., van de Yen L., van de Yen A., van Cruchten H., Rijks J. 1985. *HRC & CC*, 8, 664-672.
15. Wooley C. L., Kong R. C., Richter B. -E., Lee M. L. 1984. *HRC & CC*, 7, 329-332.
16. Trautler H. 1983. *HRC & CC*, 6, 60-63.
17. Moseley M. A., Pellizzan E. D. 1982. *HRC & CC*, 5, 472-475.
18. Pretorius V., Desty D. H. 1981. *HRC & CC*, 4, 38-39.
19. Markides K. E., Tarbet B. J., Woolley C. L., Schrengenberger C. M., Bradshaw J. S., Lee M. L., Bartle K. D. 1985. *HRC & CC*, 8, 378-384.
20. Venema A., Sukkel J. T. 1985. *HRC & CC*, 8, 705-708.
21. Von de Yen L. J. M., Rutten G., Rijks J. A., de Haan J. W. 1986. *HRC & CC*, 9, 741-746.
22. Xu B., Vermeulen N. P. E. 1986. *HRC & CC*, 9, 679-682.
23. Blum W. 1986. *HRC & CC*, 9, 120-121.
24. Pedant G., Sandra P., Verzele M. 1982. *Chromatographia*, 15, 13-14.
25. Xu B., Vermeulen N. P. E. 1985. *HRC & CC*, 8, 181-185.
26. Xu B., Vermeulen N. P. E. 1984. *Chromatographia*, 18, 642-644.
27. Xu B., Vermeulen N. P. E., Smit J. A. M. 1986. *Chromatographia*, 22, 213-218.
28. Grob K., Grab G., Grab K., Jr. 1981. *J. Chromatogr.*, 211, 243-246.
29. Grob K., Grab G. 1981. *J. Chromatogr.*, 213, 211-221.
30. Grob K., Grab G. 1982. *HRC & CC*, 5, 119-123.
31. Grob K., Grab G. 1985. *HRC & CC*, 8, 856-857.
32. Janak K., Kahle U., Tesarik K. 1985. *HRC & CC*, 8, 843-847.
33. Kong R. C.; Lee M. L. 1983. *Chromatographia*, 17, 451-453.
34. Wannman T., Blomberg L., Schmidt S. 1985. *HRC & CC*, 8, 32-44.
35. Arrendale R. F., Severson R. F., Chortyk O. T. 1983. *HRC & CC*, 6, 436-439.
36. Kong R. C., Lee M. L. 1983. *HRC & CC*, 6, 319-321.

37. Rohwer E. R., Pretorius V., Hulse G. A. 1985. HRC fc CC, 8, 693-694.
38. Sonihiro P., Temmerman I., Verstappe M. 1983. HRC & CC, 6, 501-504.
39. Grob K., Grab G. 1983. HRC & CC, 6, 133-139.
40. David F., Proot M., Sandra P. 1985. HRC fc CC, 8, 551-557.
41. De Zeeuw J., de Nijs R. C. M., Henrich L. T. 1987. J. Chromatogr. Sci., 25, 71-83.
42. De Nijs R. C. M. 1981. HRC fc CC, 4, 612-615.
43. Malik A., Jumaev A. R., Berezkin V. G. 1986. HRC & CC, 9, 312-313.
44. Beredsin V. G., Malik A., Gavrichev V. S. 1983. HRC & CC 6, 388-389.
45. Malik A., Berezkin V. G., Gavrichev V. S. 1984. Chromatographia, 19, 327-334.
46. Benecke I., Schomburg G. 1985. HRC fc CC, 8, 191-192.
47. Al-Thamir W. K. 1985. HRC fc CC, 8, 143.
48. McManemin G. J., Reuter W. 1985. HRC fc CC, 8, 80-81.
49. Grobter A., Balizs G. 1981. J. Chromatogr. Sci., 19, 46-51.
50. Freeman R. R., Kukia D. 1986. J. Chromatogr. Sci., 24, 392-395.
51. Bwjten J., Blomberg L., Markidef K., Wannman T. 1982. Chromatographia, 16, 183-187.
52. Horka M., Kahle V., Janak K., Tesarik K. 1986. Chromatographia, 21, 454-459.
53. Hinshaw J. V., Jr., Ettre L. S. 1986. Chromatographia, 21, 561-572.
54. Hinshaw J. V., Jr., Ettre L. S. 1986. Chromatographia, 21, 669-680.
55. Takeuchi T., Kitamura H., Spitzer T., Ishii D. 1983. HRC & CC, 6, 666-668.
56. Farbroth A., Folestad S., Larson M. 1986. HRC & CC, 9, 117-119.
57. Ogden M. W., McNair H. M. 1985. HRC & CC, 8, 816-823.
58. Mehran M. F., Cooper W. J., Lautamo R., Freeman R. R., Jennings W. 1985. HRC fc CC, 8, 715-717.
59. Sandra P., David F., Proot M., Diricks I. G., Verstappe M., Verzele M. 1985. HRC fc CC, 8, 782-798.
60. Bradshaw J. S., Adams N. W., Johnson R. S., Tarbet B. J., Schregenberger C. M., Pulsipher M. A., Andrus M. B., Markidef K. E., Lee M. L. 1985. HRC fc CC, 8, 678-683.
61. Markides K. E., Chang H.-C., Schregenberger C. M., Tarbet B. J., Bradshaw J. S., Lee M. L. 1985. HRC & CC, 8, 516-520.
62. Rokushika S., Naikwadi K. P., Jadhav A. L., Hatano H. 1985. HRC & CC, 8, 480-484.
63. Benecke I., Schomburg G. 1985. HRC & CC, 8, 191-192.
64. Bradshaw J. S., Crowley S. J., Harper C. W., Lee M. L. 1984. HRC & CC, 7, 89-92.
65. Kuei J. C., Shelton J. I., Castle L. W., Kong R. C., Richter B. E., Bradshaw J. S., Lee M. L. 1984. HRC fc CC, 7, 13-18.
66. Abe •L., Kwamoto S., Musha S. 1983. HRC fc CC, 6, 366-370.
67. Vigh Gy., Hiavay J., Varga-Puchony Z., Welsch T. 1982. HRC & CC, 5, 124-127.
68. Wright B. W., Peaden P. A., Lee M. L. 1982. HRC & CC, 5, 413-416.
69. Sandra P., Van Roelenbosch M., Temmerman I., Verzele M. 1982. Chromatographia, 16, 63-68.
70. Ahnoff M., Johansson L. 1984. Chromatographia, 19, 151-154.
71. Aerts A., Rijks J., Bemgard A., Blomberg L. 1986. HRC & CC, 9, 49-56.
72. Lee M. L., Kong R. C., Woolley C. L., Bradshaw J. S. 1984. J. Chromatogr. Sci., 22, 136-142.
73. Stark T., Larson P. A., Dandeneau R. D. 1983. J. Chromatogr., 279, 31-40.
74. Schomburg G., Benecke I., Severin G. 1985. HRC & CC, 8, 391-394.
75. Bemgard A., Blomberg L., Lyman M., Claude S., Tabacchi R. 1987. HRC fc CC, 10, 302-318.
76. Kuei J. C., Tarbet B. J., Jackson W. P., Bradshaw J. S., Markides K. E.; Lee M. L. 1985. Chromatographia, 20, 25-30.
77. Pulsipher M. A.; Johnson R. S., Markides K. E., Bradshaw J. S., Lee M. L. 1986. J. Chromatogr. Sci., 24, 383-391.
78. Matisova E., Hudec D., Garaj J., Kraus G., Schierhorn M., Jensenberg A. 1985. Chromatographia, 20, 601-608.
79. Jennings W. G.; Wohleb R. H., Jenkins R. G. 1981. Chromatographia, 14, 484-487.
80. Kramer J. K. G., Fouchard R. C., Jenkins K. J. 1985. J. Chromatogr. Sci., 23, 54-56.
81. Vigh Gy., Bartha A.; Hiavay J. 1981. HRC & CC, 4, 3-5.
82. Temmerman I., Sandra P., Verzele M. 1985. HRC fc CC, 8, 513-515.
83. Pizzala R. U., Freeman R. R., Plotzcyk L. L. 1983. Hewlett-Packard Application Note 228-30. HP Pub. No. 43-5953-1708.
84. Grob K., Grab G. 1981. HRC & CC, 4, 491-494.
85. Martinez de la Gandara V., Sanz J., Martinez-Castro J. 1984. HRC fc CC, 7, 44-45.
86. Lipsky S. D., McMurray W. J. 1982. J. Chromatogr., 239, 61-69.
87. Chuang C. H., Shanfield H., Zlatkis A. 1987. Chromatographia, 23, 169-170.
88. Etier O., Vigh Gy. 1984. HRC & CC, 7, 700-701.
89. Vigh Gy., Etier O. 1984. HRC & CC, 7, 620-624.
90. Barry E. F., Chabot G. E., Ferioli P., Hubball J. A., Rand E. M. 1983. HRC & CC, 6, 300-305.
91. Hubball J. A., DiMauro P. R., Barry E. F., Lyons E. A., George W. A. 1984. J. Chromatogr. Sci., 22, 185-191.
92. Schomburg G., Husmann H., Ruthe S., Herraiz M. 1982. Chromatographia, 15, 599-610.
93. Hubball J. A., DiMauro P. R., Smith S. R., Barry E. F. 1984. J. Chromatogr., 302, 341-350.
94. Etier O., Vigh Gy. 1985. HRC fc CC, 8, 42-44.
95. Richter B. E., Kuei J. C., Park N. J., Crowley S. J., Bradshaw J. S., Lee M. L. 1983. HRC & CC, 6, 371-374.
96. Lipsky S. R., Duffy M. L. 1986. HRC & CC, 8, 376-382.
97. Lipsky S. D., Duffy M. L. 1986. LC-GC 4, 898-906.
98. Lipsky S. R., Duffy M. L. 1986. HRC fc CC, 9, 725-730.
99. Seferovic W., Hinshaw J. V., Jr., Ettre L. S. 1986. J. Chromatogr. Sci., 24, 374-382.
100. De Nijs R. C. M., Dooper R. P. M. 1980. HRC & CC, 3, 583-584.
101. Freeman R. R. 1983. Hewlett-Packard Application Note AN 228-36. HP Pub. No. 43-5953-1747.
102. Grab K., Jr., Grab G., Grab G. 1978. J. Chromatogr., **186**, 1.
103. Temmerman I., Sandra P. 1986. HRC & CC, 9, 117-119.
104. Moncur J. G. 1982. HRC fc CC, 5, 53-55.
105. Lareon P., Stark T., Dandeneau R. 1981. Proceedings of the Fourth International Symposium on Capillary Chromatography. Hindelang, R. E. Kaiser, Ed., pp. 727-750.
106. Schwartz M., Klun J. A. 1982. HRC & CC, 5, 380-381.

107. *Ogden M. Ж, МсЛГог Я. М.* 1985. HRC & CC, 8, 326-331.
108. *Proot M., Sandra P.* 1986. HRC & CC, 9, 618-623.
109. *Farbrot A., Folestad S., Larsson M.* 1986. HRC & CC, 9, 117-119.
110. *Pacholec, F.* 1986. LC-GC, 4, 432-441.

Дополнительная литература

- Blomberg L. G., Markides K. E.* 1985. HRC & CC, 8, 632-650.
Blomberg L. G. 1984. HRC & CC, 7, 232-241.
Ettre L. S. 1985. Anal. Chem., **57**, 1419-1436.
Duffy M. L. 1985. Am. Laboratory, 94-105.
Grab K. 1987. J. Chromatogr., 398, 391-392.
Hinshaw J. 1988. LC-GC, 6, 24-29.
Tarbet B. J., Bradshaw J. S., Markides K. E., Jones B. A., Lee M. L.
1988. LC-GC, 6, 233-248.

Глава 3

Ввод пробы в капиллярную колонку

П. Сандра

Введение

"Если колонку часто называют сердцем хроматографии, то стадию ввода пробы в колонку можно с некоторыми оговорками назвать ахиллесовой пятой". Это высказывание Преториуса [1] отражает тот факт, что ввод пробы в капиллярной хроматографии имеет первостепенное значение. Функционирование системы ввода пробы определяет успешную работу всей хроматографической (Системы. Проведенные в последние годы исследования обеспечили существенное углубление наших представлений о явлениях, происходящих при вводе пробы в колонку. Были разработаны различные режимы ввода пробы. Необходимость использования различных вариантов ввода обусловлена, во-первых, тем, что хроматографирование определяется множеством параметров колонки, например: ее внутренним диаметром, толщиной пленки НФ, емкостью колонки, видом и линейной скоростью газа-носителя. Во-вторых, Современная капиллярная газовая хроматография позволяет анализировать соединения различной летучести и термической устойчивости в широком интервале концентраций. "Универсальный" оптимальный вариант ввода пробы в капиллярную колонку до сих пор не разработан, и сомнительно, чтобы такой вариант существовал в принципе. Дженкинс и Дженнингс [2] считают, что в настоящее время не существует и в будущем вряд ли появится устройство или методика, пригодная для ввода любых соединений в любых условиях. "Универсальной системы ввода пробы до сих пор нет и, по-видимому, никогда не будет" [3].

Однако это не означает, что нельзя получить правильные и воспроизводимые результаты с использованием различных систем ввода пробы, разработанных в последние годы. Следует только знать возможности и ограничения этих систем. Если к тому же имеется достаточно информации о составе анализируемого образца, можно с гарантией получить хорошие результаты разделения. Качественный и количественный хроматографический анализ предполагает, что полученные результаты соответствуют истинному составу смеси. Возможные искажения являются результатом несовершенства метода ввода пробы, различных эффектов колонки, детектора или совокупности этих факторов. Система ввода может обладать "дискриминационным" эффектом, т. е. некоторые компоненты пробы нельзя количественно ввести в колонку. В самой колонке может происходить необратимая или обратимая адсорбция некоторых компонентов пробы. Кроме того, функционирование колонки может зависеть от условий ввода пробы. Однако, прежде чем сделать вывод о несоответствии системы ввода пробы, следует внимательно изучить свойства колонки.

Основным требованием к системе ввода пробы в колонку является полное соответствие состава пробы, введенной в виде узкой зоны, исходному составу анализируемой смеси. Ширина зоны должна быть такой, чтобы ее дисперсия была несущественной по сравнению с дисперсией, обусловленной размытием пика. Общая измеренная дисперсия (σ_m) представляет собой сумму дисперсий:

$$\sigma_m^2 = \sigma_c^2 + \sigma_i^2 + \sigma_{ex}^2, \quad (3.1)$$

где σ_m — измеренная вариация пика (общее размытие пика), σ_c — вариация пика в колонке, σ_i — вариация пика на входе в колонку, σ_{ex} — внеколоночная вариация пика.

В современных капиллярных газохроматографических системах вклад внеколоночной дисперсии (изменение ширины пика за счет электрометра, системы обработки и регистрации данных) близок к нулю, поэтому

$$\sigma_m^2 = \sigma_c^2 + \sigma_i^2. \quad (3.2)$$

В уравнение входят величины (σ^2 , поэтому вклад изменения исходной ширины зоны в общее размытие не так существен, как это можно было предположить. Например, пик с размытием хроматографической зоны 5 с в случае исходной ширины зоны в 1 с имеет общее размытие 5,1 с, а в случае ширины зоны 2с — 5,3 с. Следовательно, для классической капиллярной колонки вполне допустима ширина исходной зоны, равная 1 с. При более высокой емкости колонки, т. е. при большем размытии хроматографической зоны, ее исходная ширина имеет еще меньшее значение.

Для введения пробы в виде узкой зоны используют два подхода:

1. В колонку вводят очень маленькие пробы (от 1 до 5 нл). Для этого используются устройства деления потока. Пары пробы, образовавшиеся за счет высокой температуры при вводе пробы, разделяются на два потока с различными объемными скоростями. Другая возможность — "холодное" деление жидкой пробы — еще пока недостаточно изучена. 2. Вся проба целиком вводится в колонку, после чего широкая исходная зона сразу же превращается в узкую. Сужение зоны достигается за счет фокусирования: термического эффекта растворителя или фокусирования посредством НФ. На практике эти приемы успешно используют при вводе пробы без делителя потока, прямо или непосредственным вводе пробы в колонку.

В следующих разделах будут более подробно рассмотрены основные системы ввода пробы, а именно:

1. Ввод пробы с делителем потока (split injection).

2. Ввод пробы без делителя потока (splitless injection).
3. Ввод пробы в колонку (on-column injection).
4. Прямой ввод пробы (direct injection).
5. Ввод пробы с программированием температуры испарителя (programmed temperature vaporizing injection).

Особое внимание будет обращено на количественную сторону различных вариантов ввода пробы. Будут рассмотрены критерии выбора системы ввода при проведении стандартных анализов, а также влияние системы ввода на оптимальные размеры хроматографической колонки.

В рамках этой книги невозможно подробно рассмотреть все аспекты, связанные со вводом пробы. В прекрасных монографиях К. Гроба-младшего [4, 5] подробно рассмотрены различные методы ввода пробы. Обзор систем ввода пробы представлен также в книге Р. Сандра "Sample Introduction in Capillary GC", Vol. 1 [3]; Vol. 2 [6].

Ввод пробы с делением потока

Метод ввода пробы с делением потока был первым, разработанным в капиллярной газовой хроматографии [7]. Обычное устройство ввода пробы с делением потока представляет собой испаритель. Пробка жидкости, введенная с помощью шприца, мгновенно испаряется, и небольшая часть паровообразной пробы поступает в колонку. Основная же часть пробы выводится из системы. Использование делителя потока гарантирует получение узких зон пробы на входе в колонку.

На рис. 3-1 схематически изображен делитель потока. Предварительно нагретый газ-носитель, расход которого устанавливается

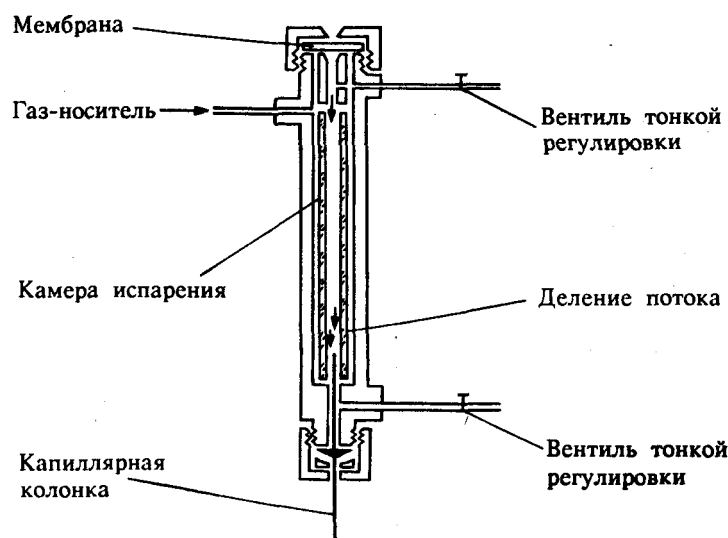


Рис. 3—1. Схема устройства ввода пробы с делителем потока.

с помощью регулятора давления или регулятора расхода в сочетании с регулятором противодавления [8], поступает в устройство ввода пробы. При этом газовый поток разделяется. Часть потока газа-носителя направляется вверх и оmyвает мембрану. Объемная скорость этого потока регулируется игольчатым вентилем и составляет обычно 3-5 мл/мин. Основная часть потока газа-носителя поступает в камеру испарения, представляющую собой вкладыш из стекла или кварца. В камере испарения паровообразная проба смешивается с газом-носителем. На входе в колонку этот смешанный поток разделяется, и только небольшая часть потока поступает в колонку. Коэффициент деления потока регулируется вентилем тонкой регулировки или регулятором потока. Для обычных капиллярных колонок внутренним диаметром 0,22-0,32 мм его значение, как правило, составляет 1:50 — 1:500. Низкие соотношения деления потока могут быть реализованы в сочетании с фокусированием пробы. Для колонок с высокой емкостью, наг пример широких или с толстым слоем НФ, соотношения деления потока обычно низкие (1:5 — 1:50). В высокоскоростной капиллярной газовой хроматографии, где используются колонки внутренним диаметром 50-100 мкм, соотношение деления потока может превышать 1:1000.

При вводе пробы с делением потока получают очень узкие исходные зоны. Однако следует учитывать, что можно, в случае необходимости, практически "на ходу" корректировать объем пробы и соотношение деления потока. Проиллюстрируем это следующим примером:

Концентрация пробы	0,01 — 0,1%
Содержание в 1 мкл	0,01 — 0,1 мг
Чувствительность пламенно-ионизационного детектора	~1 нг
Размеры колонки	25 м x 0,25 мм
Толщина пленки НФ	0,25 мкм
Емкость колонки по пробе	50 нг каждого компонента
Объем и размеры вкладыша	1 мл (8см ± 0,4см)

Объем пробы 1 мкл-0,4 мл паровообразной пробы» разбавленной газом-носителем до ~ 0,8 мл

При ширине исходной зоны 1 с объемная скорость потока через делитель должна составлять 0,8 мл/с или 50 мл/мин. При объемной скорости газа-носителя в колонке 2 и 1 мл/мин это будет достигаться соответственно при соотношениях деления потока

1:25 и 1:50. Такое рассуждение будет, разумеется, справедливо только в отсутствие эффектов фокусирования. При вводе пробы с делителем потока происходит мгновенное ее испарение, поэтому трудно избежать дискриминации (искажения) пробы. Дискриминация пробы наиболее выражена, если компоненты пробы присутствуют в разных концентрациях и имеют различную летучесть и полярность.

Дискриминация пробы при вводе с делителем потока обусловлена как характеристиками устройства ввода, так и условиями и ввода, например работой шприца.

Дискриминация компонентов пробы, обусловленная характеристиками устройства ввода, проявляется как нелинейность делителя потока. Линейность делителя потока означает, что соотношение деления потока в точке деления равно предварительно установленному и одинаково для всех компонентов пробы. Если смесь содержит компоненты с различной летучестью, полярностью и концентрацией, то линейное деление потока невозможно, даже если ввод пробы в камеру испарения происходит без дискриминации.

Нелинейность деления потока обусловлена рядом причин:

- 1) различной скоростью диффузии компонентов пробы;
- 2) неполным испарением;
- 3) нестабильностью соотношения деления потока.

Механизмы возникновения нелинейности деления потока и их относительный вклад подробно рассмотрены в книге Гроба [4].

Нелинейность деления потока удается свести к минимуму при полном испарении пробы с последующим перемешиванием ее с газом-носителем до введения в колонку. Очевидно, что часто при введении пробы с делением потока в месте деления проба представляет собой смесь паров и неоднородных капель.

Для того чтобы избежать неоднородности этой смеси, следует:

- повышать температуру ввода пробы;
- использовать оптимальную конфигурацию устройства ввода и стеклянных вкладышей.

Для достижения эффективного теплопереноса и тщательного смешения газа-носителя с испаренной пробой были предложены различные виды стеклянных вкладышей: незаполненные трубки; короткие трубки, заполненные стекловатой и помещаемые в месте деления потока или в области ввода пробы; длинные и узкие трубки со стекловатой; трубки, заполненные носителем или стеклянными шариками; трубки, переменного диаметра; трубки Дженнингса и т. д. Использование таких вкладышей в некоторых случаях помогает уменьшить дискриминацию компонентов пробы, но иногда может привести к еще большей дискриминации других компонентов.

Положительный эффект, достигаемый при использовании трубки со слоем носителя, можно продемонстрировать на примере анализа смеси метиловых эфиров жирных кислот. Такую смесь получают в процессе метанолиза масел или жиров. На рис. 3-2 представлена хроматограмма стандартной смеси эфиров и схема вкладыша. Содержание метиловых эфиров жирных кислот состава C_{10} — C_{22} можно определить с высокой правильностью и воспроизводимостью, используя способ "быстрого ввода горячей иглой". Проба вводится в стеклянный вкладыш, неплотно заполненный дезактивированными стеклянными шариками размером 100 мкм. Эфиры жирных кислот вводятся в виде раствора в изооктане. При коэффициенте деления потока 1:100 время нахождения пробы во вкладыше очень мало. Дополнительный нагрев обеспечивает полное испарение пробы и снижает дискриминацию.

Однако в некоторых случаях использование вкладышей с насадкой приводит к размыванию пика, особенно если вкладыш плотно заполнен насадкой. Это размывание обусловлено диффузией через насадку, причем предполагается, что во вкладыше не происходит ни адсорбции, ни распределения компонентов пробы. Для того чтобы избежать размывания пика, прибегают к термическому фокусированию пробы, в капиллярной колонке. В большинстве случаев теплоперенос в пустом, незаполненном вкладыше достаточен для того, чтобы проба в нем испарилась. Как правило, заполненные вкладыши не рекомендуются использовать, пока нет уверенности в том, что вкладыши без насадки не позволяют

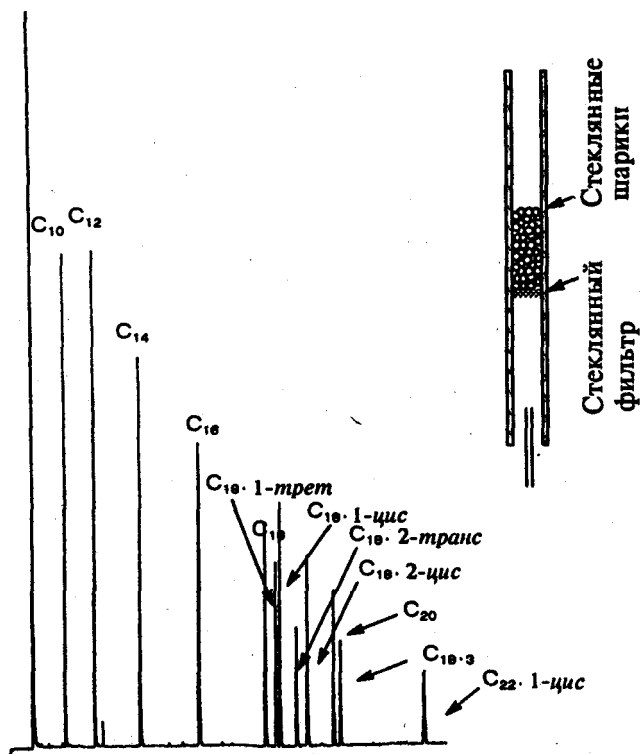


Рис. 3-2. Анализ смесей метиловых эфиров жирных кислот. Условия анализа: кварцевая колонка 25 x 0,25 мм, НФ 90% цианопро-пил, 5% винил, 5% метилсиликон, $df = 0,2$ мкм. Программированный подъем температуры от 120 до

180°C со скоростью 4 град/мин; газ-носитель водород (55 кПа), коэффициент деления потока 1:100, проба вводится в виде 0,2%-ного раствора в изеооктане.