

2. СОРБЕНТЫ

Становление ВЭЖХ в значительной мере связано с созданием новых поколений сорбентов с хорошими кинетическими характеристиками и разнообразными термодинамическими свойствами.

В классической колоночной хроматографии, как правило, используются сорбенты с частицами диаметром 30—200 мкм. На основе таких материалов можно получать колонки эффективностью до нескольких тысяч теоретических тарелок на 1 м длины. Уже такой эффективности достаточно было бы для решения множества аналитических и препаративных задач. Однако главный недостаток крупнозернистых сорбентов — большая длина пути диффузии внутри зерен. Поэтому потенциальная эффективность таких колонок если и реализуется, то лишь при малых линейных скоростях подвижной фазы. В классической колоночной хроматографии используются разнообразные по химической природе типы сорбентов, но лишь некоторые из них оказались пригодными в качестве основы для разработки материалов ВЭЖХ. Наиболее популярен из них силикагель. Другие типы материалов (окись алюминия, углеродные сорбенты) в течение последних десятилетий используются все реже. Современные материалы для ВЭЖХ имеют параметры, оптимизированные с точки зрения кинетики процесса. Их свойства и методы получения детально рассмотрены в специальной литературе, поэтому здесь мы ограничиваемся лишь той информацией, которая нужна хроматографисту-практику в первую очередь.

Основной путь улучшения кинетических характеристик сорбентов — уменьшение толщины активного слоя. Достичь этого в принципе можно двумя путями. Первый из них основан на применении так называемых пелликулярных, или поверхностно-пористых, сорбентов. Их частицы состоят из непористого ядра и активного поверхностного слоя (рис. 2.1,а). Сорбенты этого типа получили наибольшее распространение в 60—70-е годы.

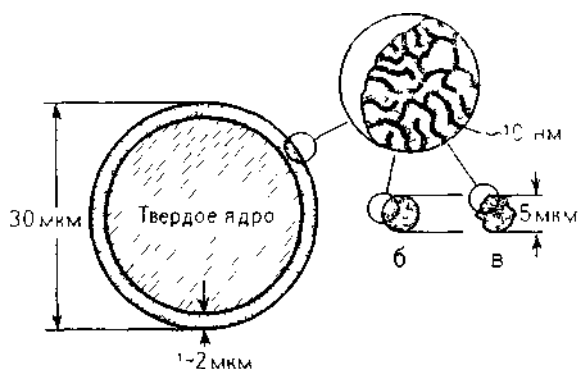


Рис 2 1 Схематическое изображение частиц пелликулярных (а) и объемно-пористых (б, в) сорбентов

Они удобны в работе, и их упаковка не требует специальной техники или навыков. Колонкам, заполненным поверхностно-пористыми сорбентами, присуще небольшое сопротивление потоку, что было особенно важно в начальный период развития ВЭЖХ, когда насосы еще не достигли своего совершенства. Недостаток этих сорбентов — в низкой сорбционной емкости колонок, так как лишь часть объема, занятого сорбентом, участвует в хроматографическом процессе.

Уменьшить толщину активного слоя можно и другим способом — уменьшением диаметра частиц обычного сорбента, пронизанного порами на всю его толщину. Сорбенты такого типа называются объемно-пористыми, обычно размер их частиц 3—10 мкм (рис. 21,б). Естественно, такие материалы создают значительно большее сопротивление потоку подвижной фазы в колонке, и рабочее давление последней значительно выше, чем при использовании пелликулярных сорбентов. Этот недостаток был особенно ощутим в первые годы развития ВЭЖХ, что заставило конструкторов создавать насосы для работы при давлениях 400—800 атм. Однако с течением времени значительно улучшилась однородность сорбентов по размеру частиц и оказалось, что такие давления вовсе не нужны. Современные колонки ВЭЖХ, заполненные сорбентами этого типа, работают, как правило, при давлениях 50—150 атм.

При использовании объемно-пористых сорбентов объем активной неподвижной фазы максимален, благодаря чему ВЭЖХ приобрела не только аналитическое, но и препаративное зна-

чение

Технология упаковки колонок объемно-пористыми сорбентами постепенно совершенствовалась, и к настоящему времени эффективность колонок, выпускаемых лучшими фирмами, почти достигла теоретического предела. Современные колонки, заполненные объемно-пористыми сорбентами, превосходят таковые со старыми пелликулярными материалами как по скорости разделения и эффективности, так и большинству других показателей. В результате пелликулярные сорбенты почти вытеснены из аналитической практики и применяются сейчас только для заполнения вспомогательных колонок (форколонок), позволяющих продлить срок службы основных

Полезные свойства силикагеля определяются возможностью получения материалов с заданным размером частиц, различными размерами пор сорбентов, разной удельной поверхностью и высокой механической прочностью. Ведущие фирмы-производители выпускают десятки сортов силикагеля, пригодного для решения разнообразных задач разделения. Именно силикагель чаще всего служит сорбентом в режиме нормально-фазовой хроматографии. В этом случае сорбция разделяемых соединений определяется их способностью взаимодействовать с поверхностными силанольными (Si-OH) и силоксановыми (Si-O-Si) группами.

Большую популярность с 1971 г. приобрели химически модифицированные силикагели. Принцип их получения чаще всего заключается в обработке поверхности силикагеля органилгалогенсиланами (рис. 2.2).

В зависимости от природы органического радикала R могут быть получены разные сорбенты. Условно химически модифицированные силикагели можно отнести к одной из двух групп — сорбентам общего назначения либо сверхселективным. Выпуск сорбентов первой группы в настоящее время широко освоен в промышленном масштабе. В качестве органических радикалов чаще всего используют следующие:

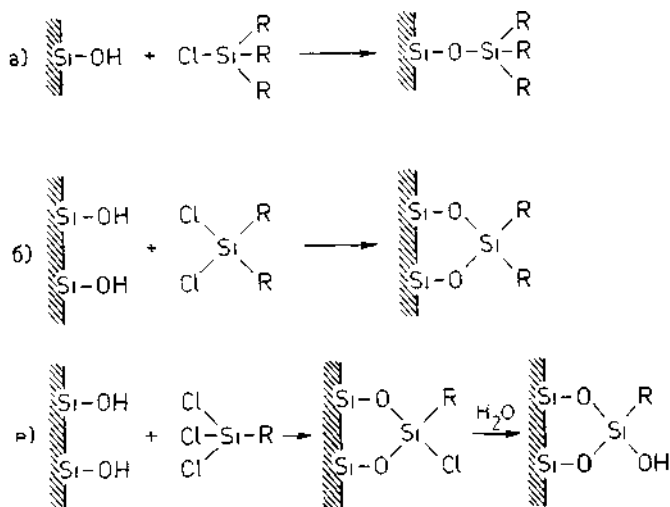


Рис. 2.2 Схема получения химически модифицированных силикагелей с помощью а) моно-, б) ди-, в) трихлорсиланов

— CH_3 — (C_1) — метилсиликагель, применяется в обращенно-фазовом режиме обычно для разделения высокомолекулярных веществ;

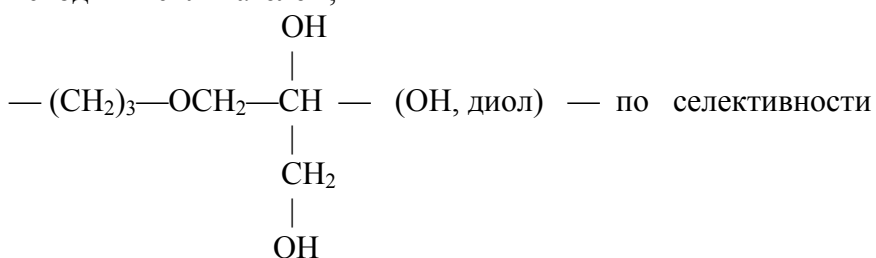
— $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$ — (C_8) — занимает среднее положение в ряду неполярных сорбентов C_1 — C_{18} . может быть использован для ориентировочного разделения смесей неизвестного состава;

— $(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ — (C_{18} , ODS) — предназначен для разделения широкого круга веществ от умеренно- до высокополярных. Сорбент пригоден для работы в режиме ион-парной хроматографии. Обладает высокой селективностью по отношению к гомологам;

— $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ и — $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)_2$ — (фенил, дифенил) — по сравнению с другими неполярными сорбентами менее селективен по отношению к гомологам. Может быть рекомендован преимущественно для разделения веществ различных классов, в особенности оснований;

— $(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ — (NH_2 , аминсиликагель) — используется для обращенно- и нормально-фазовой хроматографии. В водных подвижных фазах сорбент может найти применение как слабый анионообменник для разделения кислот. Часто используется для хроматографии Сахаров в водно-органических системах. Следует избегать использования сорбентов, содержащих альдегидные или кетогруппы, которые могут образовывать с аминогруппами сорбата шиффовы основания;

— $(\text{CH}_2)_3\text{CN}$ — (CN, нитрил) — может быть использован в системах с водными и органическими подвижными фазами; в последнем случае напоминает по свойствам силикагель, однако присутствие нитрильной группы изменяет селективность этого материала по сравнению с исходным силикагелем;



значительно отличается от немодифицированного силикагеля;

— $(\text{CH}_2)_3\text{N}^+\text{R}_3$ — (SAX) сильный анионообменник, используется для разделения кислот;

— $(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{H}$ — (SCX) — сильный катионообменник, используется для разделения оснований.

Успехи в области химической модификации силикагеля дают возможность многим исследователям проводить целенаправленный синтез материалов, обладающих определенными свойствами. К настоящему времени в литературе описаны многие десятки разнообразных органических лигандов. Однако лишь незначительная их доля (кроме перечисленных выше) включается в программу фирм-производителей сорбентов. Это, несомненно, объясняется тем, что на уже освоенных в массовом производстве нескольких типах сорбентов можно успешно решать 99% всех возникающих задач. Все же иногда выбор оригинального лиганда может придать сорбенту качественно новые свойства. Например, модификация оптически активными радикалами позволяет разделять на полученном хиральном сорбенте рацематы некоторых родственных лиганду веществ.

При выборе неподвижной фазы для разделения той или иной смеси необходимо исходить в первую очередь из свойств разделяемых соединений. Полярность разделяемых веществ непосредственно сказывается на их растворимости в растворителях различных классов, поэтому она служит первым критерием выбора. Одновременно следует иметь в виду, что часто возможно решение одной и той же задачи на сорбентах различных типов и что сорбционные свойства материала иногда могут радикально изменяться в зависимости от характера подвижной фазы. Одна из возможных схем выбора представлена на рис. 2.3.

Наименее полярные органические соединения — углеводороды, их галогензамещенные производные, а также кислородсодержащие соединения с большими алифатическими радикалами, как правило, хорошо растворимы в гексане. Вещества этой группы довольно слабо удерживаются силикагелем, и для их хроматографии потребовались бы очень малополярные подвижные фазы. Однако силикагель медленно уравнивается такими растворителями, и получить достаточно стабильные величины удерживания непросто. Потому для сорбатов этого типа можно рекомендовать обращенно-фазовую хроматографию. В качестве подвижной фазы необходимо брать растворы, содержащие 0—30% воды в ацетонитриле или метаноле, а для наименее полярных сорбатов (например, триглицериды, высшие полиядерные ароматические углеводороды) — смеси ацетонитрила с хлороформом либо хлористым метиленом.

Органические соединения промежуточной полярности растворяются в сложных эфирах, спиртах, хлороформе. Эти вещества имеют в составе молекул функциональные группы, способные к довольно сильному взаимодействию с силанольными группами силикагеля, полярными функциональными группами химически модифицированных силикагелей.

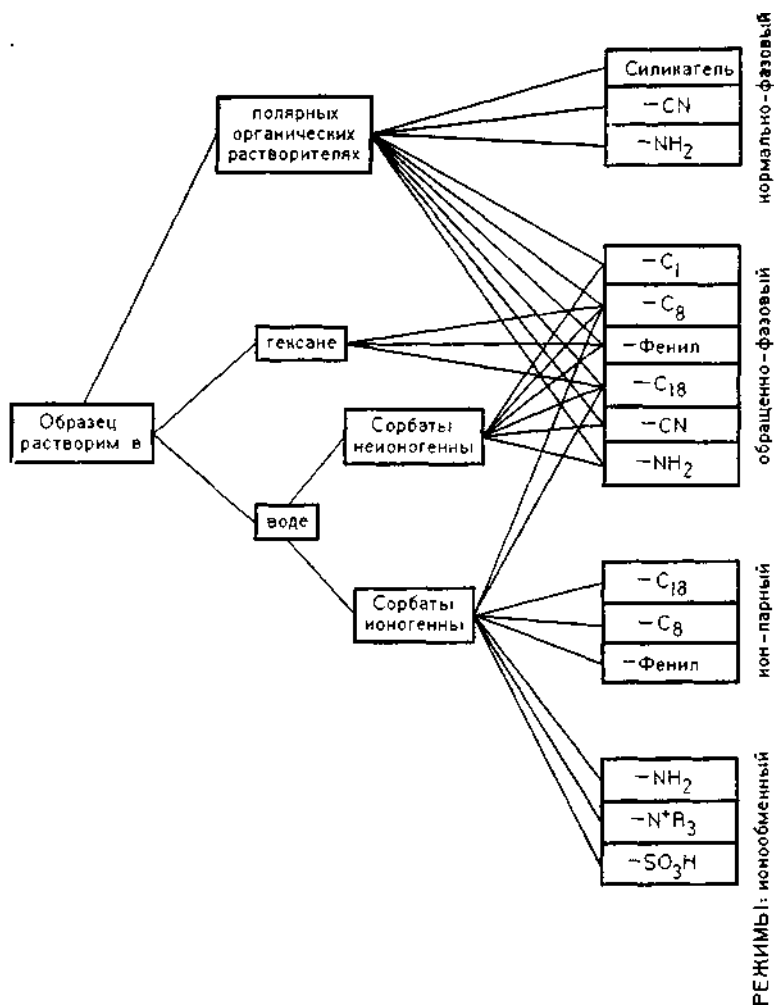


Рис. 2 3. Схема выбора неподвижной фазы для разделения низкомолекулярных органических соединений.

Подвижные фазы для хроматографии на этих сорбентах содержат 2—50% полярного органического растворителя в смеси с менее полярными (углеводороды, галогенуглеводороды). Равновесие между силикагелем и такими растворами устанавливается быстро, и оно довольно устойчиво. Поэтому результаты хроматографии обычно с легкостью воспроизводимы. Разделение на силикагеле более селективно по отношению к пространственной структуре сорбатов, в силу чего нормально-фазовая хроматография наиболее предпочтительна, если предстоит разделение изомеров.

Многие полярные органические соединения растворимы в воде, и потому для них обычно используют обращенно-фазовую хроматографию. Подвижная фаза содержит 0—50% органического растворителя (метанол, ацетонитрил) в воде. Соединения выходят из колонки в порядке убывания полярности. Если сорбаты ионизированы в водных растворах, с целью улучшения формы пика и воспроизводимости результатов в подвижную фазу добавляют соли, кислоты, буферные растворы для поддержания необходимой ионной силы и pH.

Для ионогенных соединений существуют и другие варианты выбора хроматографической системы. Во-первых, это ионообменная хроматография на материалах, которые по химизму взаимодействия повторяют классические иониты. Недостатком такого режима является сравнительно невысокая эффективность разделения. Подвижная фаза, как правило, представляет собой буферный раствор. Его pH и ионная сила подбираются таким образом, чтобы обеспечить желаемые значения констант сорбции. Другой режим разделения ионогенных соединений — так называемая ион-парная хроматография. Методически суть ее сводится к тому, что в обычную обращенно-фазовую систему добавляют гидрофобные ионы, имеющие заряд, противоположный по знаку заряду разделяемых ионов. Этот прием позволяет получить пики ионогенных соединений почти идеальной формы, что редко достигается при обычной обращенно-фазовой или ионообменной хроматографии соединений данной группы.