**Сорбенты**

Сорбенты, используемые для хроматографии, делят на несколько групп, каждая из которых, в свою очередь, подразделяется на типы. Классификация сорбентов может основываться на ряде признаков. Общепринятым является разделение сорбентов на группы по химической природе матрицы (основы) сорбента, а по типам – по методу химической обработки матрицы, делающей ее пригодной для использования в определенном виде хроматографии.

Основными группами сорбентов являются: 1) поверхностно-пористые сорбенты, представляющие собой непроницаемое для растворителя твердое ядро из стекла, на поверхность которого занесен тонкий слой пористого абсорбента, обычно силикагеля; 2) пористые сорбенты на основе силикагеля; 3) пористые сорбенты на основе оксида алюминия; 4) пористые сорбенты на полимерной основе.

Сорбенты первой группы были исторически первыми, стимулировавшими быстрый рост ВЭЖХ. Они представляют собой стеклянные микрошарики размером 35–50 мкм, на поверхности которых различными способами закрепляется слой силикагеля или оксида алюминия толщиной в 1–2 мкм. Этот слой кет либо использоваться для разделения методом адсорбционной хроматографии, либо модифицироваться нанесением подвижной фазы. Нанесение фазы возможно динамическим методом из растворителя, методом испарения раствора фазы, как в ГХ; наноситься могут индивидуальные вещества или же полимеры; наконец, фазами могут служить химически привитые пленки как в виде монослоев (щеточные сорбенты), так и в виде полимерных пленок разной толщины.

Создание этих сорбентов, называвшихся также пелликулярными, позволило заполнять сухим способом достаточно длинные эффективные колонки и проводить разделения разного типа достаточно быстро. Обычно эффективность составляла для колонок длиной 1–2 м 2–4 тыс. т.т. при продолжительности анализа 20–80 мин. Недостатки физически нанесенных фаз стимулировали быстрое развитие методов химической прививки фаз, далее широко использовавшихся для других групп сорбентов.

Наряду с достоинствами поверхностно-пористых сорбентов (возможность упаковки в колонки сухим способом, легкость фракционирования, широкий ассортимент привитых и нанесенных фаз) обнаружились их серьезные недостатки. Главными следует считать малую емкость по пробе, связанную с малой поверхностью сорбента в колонке (основной объем сорбента занимает непористое ядро, не участвующее в разделении), большое гидравлическое сопротивление длинных колонок, их малую производительность и быструю перегрузку в препаративной работе, сложную технологию получения сорбентов и их высокую цену, недостаточную эффективность колонок и длительность анализа.

В настоящее время поверхностно-пористые сорбенты практически не используют для аналитической работы. Единственная область применения, которая для них сейчас осталась, – это использование в предколонках. Предколонки устанавливают перед аналитической колонкой для улавливания необратимо сорбируемых загрязнений из проб, особенно в медицине и биологии. Однако несмотря на легкость перезаполнения сухим способом таких предколонок, их малая емкость по примесям по сравнению с пористыми микрочастицами и, следовательно, необходимость частого перезаполнения с большой затратой времени и сорбента позволяют усомниться в целесообразности их использования и в этой области.

Дальнейшее быстрое развитие ВЭЖХ базировалось на новом поколении сорбентов: микрочастицах диаметром от 3 до 10 мкм, главным образом на основе силикагеля, частично – оксида алюминия, а в последнее время на основе пористых полимеров.

**Силикагель, его структура и химия поверхности**

Силикагель представляет собой почти чистый диоксид кремния SiO2, однако технические его сорта содержат примеси. Силикагель всегда содержит большие, или меньшие количества адсорбированной воды (на этом основано его широкое использование в качестве осушителя). Кроме того, технический силикагель содержит другие оксиды, прежде всего оксид алюминия, также железа, который придает техническому силикагелю желтоватый или даже коричневый цвет. Силикагель имеет разную поверхность, составляющую обычно 100–600 м2/ г, и значительный объем пор (0,5–1,2 мл/г) с преобладанием пор диаметром от 5 до 15 нм.

Силикагель получают разными способами, позволяющими варьировать его чистоту и другие свойства. Наиболее общим является метод получения силикагеля из так называемого жидкого стекла, представляющего собой натриевую соль поликремневой кислоты, путем его обработки кислотами с последующим высушиванием образующейся поликремневой кислоты, разлом получающегося кускового силикагеля и выделением жной фракции рассеиванием. Такой метод был исторически первым, использовавшимся для получения силикагеля, применяемого в колоночной (классической) и тонкослойной хроматографии. На базе такого же силикагеля были получены первые сорбенты специально для ВЭЖХ типа партисил (фирма «Ватман») и лихросорб (фирма «Мерк»). Получали их путем сепарирования на специально разработанных воздушных сепараторах силикагеля для ТСХ.

В дальнейшем были разработаны способы получения силикагелей специально для ВЭЖХ путем направленного формования в процессе синтеза силикагеля микросфер нужной фракции с преобладанием частиц размером 3–12 мкм (фирмы Дюпон», «Мерк», «Мэчери-Нэгель», «Фейз Сепарейшн», «Сепарейшенс Груп», «Шендон Саусерн» и др.) под торговыми марками соответственно зорбакс, лихросфер, нуклеосил, сферисорб, видак, хайперсил. Регулированием процессов формования микросферического силикагеля и его отверждения, сушки последующей химической обработки получается широкая гамма сорбентов для ВЭЖХ зернением 3, 5, 7 и 10 мкм с узким фракционным составом. Если процесс формования не позволяет получить сразу узкую фракцию микросфер, их подвергают воздушному сепарированию, так же как и размолотый кусковой силикагель.

В настоящее время разные фирмы производят более 200 сорбенгов для ВЭЖХ на основе силикагеля как с неправильной формой частиц, так и в виде микросфер. Ассортимент их непрерывно расширяется за счет появления новых привитых фаз к известным силикагелям для ВЭЖХ или же новых вариантов прививки тех же фаз, появления новых силикагелевых матриц с более широкими порами или более узко сепарированных, появления новых фирм-производителей.

Вопрос о том, являются ли частицы сферической формы предпочтительными по сравнению с частицами неправильной формы и обеспечивают ли они получение каких-либо особых преимуществ, обсуждался многими авторами, однако никаких убедительных доказательств большей эффективности, стабильности, проницаемости более дорогих микросферических сорбентов представлено не было. Тем не менее следует отметить, что большая часть вновь появляющихся сорбентов имеет форму микросфер.

Химия поверхности силикагеля для ВЭЖХ независимо от способа его получения примерно одна и та же. Поверхностный слой силикагеля, который в дальнейшем работает как адсорбент или же служит той матрицей, к которой прививают химически неподвижную фазу, можно представить себе следующим образом (рис. 4.1). На поверхности силикагеля, таким образом, можно обнаружить несколько видов групп, способных к взаимодействию с веществами в процессе последующего хроматографического анализа или в процессе прививки неподвижной фазы. Прежде всего, это может быть силанольная группа со свободным гидроксилом (тип I). Во-вторых, это может быть силанольная группа, свободный гидроксил которой образует с соседним атомом кислорода за счет его неподеленной пары электронов водородную связь (тип II), при этом образуется устойчивый шестичленный цикл. В-третьих, это может быть силоксановый мостик, который образуется за счет отщепления молекулы воды от двух силанольных групп (тип III). Последний тип связи может за счет обратимой реакции гидролиза превратиться в две силанольные группы (тип I).

Количество групп как силанольных, так и силоксановых на единицу массы силикагеля зависит от ряда факторов. Так, чем больше удельная поверхность силикагеля (она меняется в пределах от 1000 до 15 м2/г), тем больше групп обоих типов находится на сорбенте в колонке и, следовательно, сильнее удерживание взаимодействующих с ними веществ. Далее, в процессе получения силикагеля он подвергается сушке, от длительности и условий которой зависит соотношение силоксановых и силанольных групп. При сушке геля поликремневой кислоты – исходного продукта для силикагеля – сначала идет поликонденсация с выделением воды и образованием жесткого скелета силикагеля. При нагревании до 200 °С вся физически сорбированная вода удаляется, а поверхность остается полностью гидроксилированной, т.е. количество силанольных групп будет максимальным, а силоксановых – минимальным. Если продолжить нагревание, силанольные группы начнут отщеплять воду с образованием силоксановых групп; этот процесс заканчивается примерно при 1000 °С. Дальнейшее нагревание приводит к спеканию частиц силикагеля с уменьшением как объема пор, так и размера частиц, а затем и к плавлению с образованием кварца.

Силанольные группы, располагающиеся на поверхности силикагеля, обладают слабокислыми свойствами и способны поэтому сильнее удерживать вещества с основными свойствами. Силоксановые группы могут в процессе работы за счет гидролиза переходить в силанольные, что меняет свойства поверхности сорбента и удерживание веществ.

**Оксид алюминия**

Оксид алюминия, применяемый в качестве сорбента как в газовой, так и в жидкостной хроматографии, получают путем дегидратации при высушивании гидроксида алюминия (III). Зависимости от условий дегидратации получают ряд форм – модификаций кристаллической формы оксида алюминия, из которых для хроматографии используют гамма-оксид алюминия.

Применяемый для хроматографии оксид алюминия отвечает формула, в которой на две молекулы оксида приходится молекула воды. Его поверхность и структура похожи на силикагелeвые, однако не идентичны и обеспечивают в ряде случаев селективность, отличающуюся от селективности силикагеля. Поверхностные гидроксилы оксида алюминия более прочны и полностью удаляются даже при 1000 °С. Обратная гидратация поверхности при комнатной температуре протекает медленно. Ионы алюминия в отличие от ионов кремния способны взаимодействию с многими молекулами разделяемых веществ влоть до необратимой сорбции некоторых молекул) и дают ой вклад в удерживание.

Хотя оксид алюминия широко и давно используют в колонной и тонкослойной хроматографии, его применение в ВЭЖХ имеет ограниченный характер. Это связано с тем, что микрочастицы оксида алюминия выпускают не все фирмы-производители сорбентов, а привитые фазы на этой основе не выпускаются совсем. Тем не менее в некоторых случаях, когда требуется селективность, отличная от селективности силикагеля, оксид алюминия применяют. Его также используют и в тех случаях, когда нужно перейти к ВЭЖХ от методики ТСХ, размотанной на пластинках с оксидом алюминия.

**Привитые сорбенты на основе силикагеля для нормально-фазной и обращенно-фазной хроматографии**

Сорбенты с химически привитыми фазами на основе силикагеля появились позже сорбентов, на которые неподвижная фаза (в виде индивидуальных веществ или, чаще, полимеров различной структуры и полярности) наносилась физически, т.е. аналогично тому, как фазу наносили и продолжают наносить в газожидкостной хроматографии. Нанесенная фаза довольно быстро смывается растворителем (гораздо быстрее, чем она испаряется или изменяется в газожидкостной хроматографии), параметры удерживания постоянно меняются, препаративно собираемые фракции загрязняются фазой. Использование растворителя, насыщенного неподвижной фазой, позволило несколько повысить стабильность таких сорбентов и колонок, однако большинство недостатков при этом осталось.

Эти проблемы можно решить, если химически привить органическую неподвижную фазу к силикагелевой матрице. Силанольные группы, находящиеся в большом количестве на поверхности силикагеля (особенно полностью гидроксилированного), обладают слабокислыми свойствами и довольно легко вступают в многочисленные реакции. Первые из полученных таким путем привитофазных сорбентов, названных «щеточные» (привитые молекулы, как щетина в щетке, покрывали поверхность силикагеля), изготовляли этерификацией силанолов спиртами с образованием простой эфирной связи. Однако обратимость реакции, особенно в кислой и щелочной средах и в присутствии водных подвижных фаз, в большой мере ограничивала как срок работы таких сорбентов, так и области их применения.

Позднее были разработаны методы получения привитых фаз разного типа с использованием гораздо более прочных и устойчивых к гидролизу связей Si-О–Si и Sj-С. Практически все имеющиеся в продаже привитофазные сорбенты относятся к этому типу, их более 200. Привить химически фазу к силикагелю может любой высококвалифицированный химик-органик по имеющимся прописям. Однако приготовить сорбент, воспроизводимый от партии к партии, чрезвычайно трудно, это не всегда удается даже обладающим как патентами, так и «ноу-хау» лабораториям и производствам фирм-изготовителей. Еще более проблематичной является попытка воспроизвести в лаборатории какой-то фирменный сорбент по имеющимся литературным и патентным данным; множество нюансов в подготовке исходного силикагеля, растворителей и реагентов, проведении реакции, удалении непрореагировавших реагентов и побочных продуктов сводят шансы на удачу почти к нулю. Точно так же проблематичным является использование при воспроизведении описанных в литературе разделений «аналогов» сорбентов других форм, что в первую очередь относится к сложным разделениям и использованию обращенно-фазных сорбентов. Сказать «использовался обращенно-фазный сорбент, представляющий собой октадецилсилан, привитый к силикагелю», – значит не сказать почти ничего, если не указана фирма-производитель. Многочисленные описанные в литературе случаи инверсии порядка выхода пиков смесей на разных сорбентах «С18 на силикагеле» и других или даже полной адсорбции ряда веществ на другом сорбенте подтверждают этот факт.

Тем не менее привито-фазные сорбенты сейчас наиболее популярны, несмотря на их высокую стоимость и отмеченные недостатки. Более 60% разделений методом ВЭЖХ (по другим данным-более 70%) выполняют с использованием только обращенно-фазных привитых сорбентов, основным из которых является сорбент с привитой фазой C18.

Можно отметить следующие преимущества, обеспечивающие преобладающее использование привитых сорбентов на основе силикагеля: механическая устойчивость к высоким давлениям; отсутствие перехода привитой фазы в растворитель в процессе хроматографического разделения (если не протекают реакции, приводящие к химическому отщеплению привитой фазы); устойчивость к действию растворителей, температуры, воды, рН; быстрота установления равновесия при смене элюента, что обеспечивает оперативность работы и возможность работы в градиентном режиме с быстрым возвратом к исходному режиму; возможность варьировать в широких пределах селективность за счет изменения степени прививки, дополнительной химической обработки и замены растворителя.

Так как среди начинающих работать в области ВЭЖХ очень большой процент составляют специалисты по ГХ, имеет смысл сделать следующее замечание. Очень большой ассортимент неподвижных фаз (неоправданно большой, по мнению многих компетентных ученых) в ГХ и стремление иметь как можно более широкий выбор фаз и в ВЭЖХ–основная ошибка начинающих. Если в газовой хроматографии, по крайней мере в ее классическом варианте, подвижная фаза практически не оказывает влияния на селективность разделения, то в жидкостной хроматографии ее влияние огромно. Так как в разделении очень активно участвуют как привитая фаза, так и адсорбированные (абсорбированные) компоненты подвижной фазы, широкий ассортимент сорбентов для ВЭЖХ в большинстве случаев не нужен. Изменением состава подвижной фазы очень часто легко добиться той же селективности, что и за счет применения нового дорогостоящего привито-фазного сорбента. Приведенное выше утверждение не относится, конечно, к принципиально новым вариантам сорбентов для ВЭЖХ (например, особо широкопористым, предназначенным для работы с большими молекулами, такими, как белки). Для начинающего же работать в ВЭЖХ рекомендуется тщательно изучить 2–4 сорбента, находящие применение для его объектов исследования, и широкий ассортимент растворителей и добавок разного типа, их влияние на разделение данного класса веществ на выбранной группе сорбентов. Только после того, как приобретен опыт работы с привитыми фазами в комплексе с растворителями, но есть задачи, которые не удается решить с их помощью, следует пробовать новые привитые фазы. Справедливость данного замечания как раз и подтверждается тем, что 60–70% успешных разделений, описанных в литературе, проведено только на привитых фазах одного типа – обращенно-фазных, к рассмотрению которых мы сейчас и перейдем.

Наиболее популярными являются так называемые обращенные привитые фазы, применяемые в обращенно-фазной ВЭЖХ. Понятие «обращенный» пришло от классической ЖХ на силикагеле, где в «прямой» системе подвижная фаза неполярна. а неподвижная полярна (соответственно гексан и силикагель). По этому принципу «обращенная» система должна иметь полярную подвижную фазу и неполярную неподвижную (соответственно водный метанол и октадецилсилан на силикагеле, привитый химически). Названия обращенно-фазный сорбент и обращенно-фазная система не являются особенно удачными или понятными, однако так как это название общепринято, то мы будем его придерживаться.

Поверхность силикагеля, как известно, – довольно большая и развитая (обычно 100–600 м2/г), и в случае гидроксилированного силикагеля покрыта в основном силанольными группами, имеющими концентрацию около 5 на 1 нм2 поверхности. Расчетная максимальная плотность силанольных групп на поверхности несколько выше и составляет около 8 на 1 нм2. Полное гидроксилирование поверхности силикагеля достигается путем его обработки водой при кипении в течение нескольких часов.

Для получения обращенно-фазного сорбента гидроксилированный силикагель обычно обрабатывают хлорсиланами, которые вступают в реакцию довольно активно и образуют при этом устойчивые к гидролизу связи – Si-О–Si-С– Несмотдя на кажущуюся простоту процесса, оказалось, что имеются многочисленные сложности. Первоначально считали, что все силанольные группы вступят в реакцию с образованием мономолекулярного слоя привитой фазы. На практике оказалось, что не все силанольные группы, а только 1,5–2,2 на 1 нм2 вступят в реакцию с алкилхлорсиланами, а остальные не могут реагировать вследствие стерических препятствий и остаются на поверхности сорбента. Правда, привитые группы стерически затрудняют подход к ним молекул анализируемых веществ в процессе разделения.

Первоначально использовали для прививки промышленно доступные три- и дихлорсиланы (октадецилтрихлорсилан и др.), которые, будучи ди- и трифунк-циональными, способны вступать друг с другом в реакцию полимеризации до того, как вступят в реакцию с силанольными группами. Эта полимеризация приводит к тому, что на поверхности могут образоваться значительно более толстые, чем мономолекулярные, полимерные слои фазы (более или менее сильно привитые к поверхности силикагелевой матрицы). В этом случае содержание привитого углерода, определяемое сжиганием, окажется выше, чем теоретически должно привиться по схеме монослойного покрытия поверхности силикагеля. При этом, несмотря на сильное удерживание пробы из-за высокого содержания привитой фазы, эффективность разделения за счет затрудненной диффузии в толстых полимерных пленках может заметно упасть. В то же время большие участки поверхности силикагеля окажутся не покрытыми фазой, что приведет к сильному взаимодействию анализируемых веществ с неэкранированными силанольными группами.

Старые, давно разработанные обращенно-фазные сорбенты, как правило, получали обработкой силикагеля октадецил- или октилтрихлорсиланами. При этом покрытие поверхности было неполным, а привитые слои в той или иной степени (в зависимости от содержания воды в растворителе, степени безводности силикагеля, герметичности аппаратуры, технологии и т.д.) были полимеризованы.

Работа по улучшению качества привитого слоя велась разными учеными постоянно и в разных направлениях. С целью устранения полимеризации прививаемого агента было предложено использовать монохлорсиланы (например, диметилокта-децилхлорсилан, диметилоктилхлорсилан и др.), которые по природе своей монофункциональны и могут дать только мономерный привитой слой. Вода дезактивирует монохлорсиланы, вступая с ними в реакцию, однако в реакцию прививки они уже не вступают и после окончания реакции отмываются вместе непрореагировавшим исходным алкилдиметилхлорсиланом. С целью устранения влияния остаточных силанольных групп было предложено после проведения прививки вести так называемое «окончательное замещение», или «энд кэппинг». В этом случае после прививки основной фазы сорбент обрабатывают сильными реагентами с минимальным мольным объемом (на пример, триметилхлорсиланом), которые блокируют основную массу непрореагировавших силанольных групп. С целью получения сорбентов с более воспроизводимыми хроматографическими свойствами значительно больше внимания стало удеяться качеству растворителей и прививаемых силанов, подготовке (гидроксилированию) исходного силикагеля.

По мере разработки усовершенствованных методов прививки обращенных фаз практически все фирмы имели возможность использовать их для производства нового поколения сорбентов. Тем не менее не было прекращено производство старых сорбентов. В чем причина этого? Причин несколько, но основными являются две: наличие – налаженного производства сорбентов по старой технологии и нежелание его прекращать или перестраивать; разработанные методы анализа разных смесей и требования потребителей, не желающих менять свои методики анализа. Более консервативные фирмы, имеющие хороший сбыт старых обращенно-фазных сорбентов, продолжают их выпускать, а более прогрессивные наряду с выпуском старых организуют выпуск новых модификаций сорбентов, вводя для них отличительные знаки или цифры. Так, фирма «Ватман» имеет четыре варианта сорбента «октадецилсилан на силикагеле», при этом силикагелевая матрица одна и та же, фирма «Уотерс» – не менее трех, различающихся методом прививки и силикагелевыми матрицами (два сферической формы и один – неправильной), фирма «Фэйс Сепарейшн» – два варианта на одной силикагелевой матрице и т.д.

Ознакомившись с этими данными, начинающий и даже более опытный специалист по ВЭЖХ обычно задает вопрос: какой же обращенно-фазный сорбент следует считать наилучшим и приближающимся к идеальному? Ответить на такой вопрос конкретным названием сорбента, к сожалению, невозможно по многим причинам. Основной из них является то, что наилучшим, с точки зрения хроматографии, является тот сорбент, который обеспечивает для данной смеси наилучшее разделение в кратчайший срок. Зачастую сниженная химическая однородность поверхности старых сорбентов в результате комбинированного (распределительного и адсорбционного, иногда в сочетании с ионообменным) механизма удерживания обеспечивает такое разделение, а сорбент с химически более однородной поверхностью не обеспечивает.

Однако, если поставить вопрос в другой форме, а именно: какой сорбент теоретически является идеальным для обращенно-фазной хроматографии и каким требованиям должен отвечать соответствующий реальный сорбент – ответить можно более конкретно. Идеальным для обращенно-фазной хроматографии следует считать сорбент, обеспечивающий «чисто обращенно-фазное» взаимодействие растворенного вещества с его поверхностью, т.е. при полном отсутствии влияния адсорбции, взаимодействия с полярны. ми группами, ионообменных и эксклюзионных процессов. Исходя из этого, приближающийся к идеальному реальный сорбент должен иметь максимально полное покрытие поверхности мономолекулярным слоем привитой фазы, в нем должны отсутствовать доступные для взаимодействия с анализируемыми веществами силанольные и другие полярные группы или группы с ионообменными свойствами, он должен иметь минимальное количество таких групп, которые экранированы и недоступны для подобных взаимодействий (теоретически), и иметь поры, практически исключающие вклад в удерживание анализируемых веществ эксклюзионных процессов. Такой сорбент должен, по имеющимся представлениям, иметь поры размером 10–30 нм (для анализа веществ с молекулярной массой до 800–1000). Перед прививкой поверхность сорбента должна быть полностью гидроксилирована, однако сорбент не должен содержать адсорбированной воды. Прививку следует проводить с использованием монохлорсиланов, например октадецилдиметилхлорсилана, в условиях, обеспечивающих наиболее полное протекание реакции с силанольными группами. После окончания прививки проводят «энд кеппинг», т.е. обработку триметилхлорсиланом для окончательного устранения доступных силанольных групп на поверхности сорбента. Наконец, сорбент должен быть полностью отмыт после окончания реакции от всех остатков использовавшихся рактивов и побочных продуктов реакции.

Каждому хроматографисту приходится решать, какой же из доступных для него обращенно-фазных сорбентов является наиболее приближающимся к идеальному. При этом ему приводится пользоваться данными фирмы о размере пор (среднем) У их кривой распределения, об объеме пор, поверхности сорбента, прививаемом агенте, наличии или отсутствии дополнительной обработки («энд кэппинга»). Эти данные, как правило, неполные и не содержат многих важных сведений, касающихся технологии и в большой мере определяющих качество сорбента. кроме того, многие данные носят рекламный характер.

Силикагель, используемый как матрица для последующей прививки неподвижной фазы, играет важнейшую роль в определении конечных свойств получаемого сорбента. Он имеет пространственно-пористую структуру, образованную диоксидом кремния в процессе образования золя, геля и последующей его сушки с удалением физически сорбированной воды. В зависимости от условий формования силикагеля могут быть получены образцы со средними размерами пор от 3 до 10 нм. За счет последующей гидротермальной обработки силикагеля может быть достигнуто значительное увеличение размера пор (до 20–50 нм и более) при сохранении в основном объема пор. Методами формования микросферических сорбентов для ВЭЖХ из тетраэтоксисилана за счет варьирования условий формования и отверждения, выбора растворителей и т.п. удается добиться получения силикагеля с достаточно высокой пористостью (свободный объем пор 0,7–1,2 мл/л) и порами от 5 до 400 нм и более.

Какую же силикагелевую матрицу использовать для прививки неподвижной фазы? Следует учитывать ряд важных обстоятельств. Если использовать матрицу с порами 3–5 нм, размер таких пор соизмерим с длиной цепи октадецилсилана (около 1 нм). Если предположить плотную прививку к такому сорбенту октадецилсилановых групп, становится очевидным, что узкие поры уменьшатся в диаметре очень значительно (некоторые даже вообще закроются) и станут недоступными для попадания в них крупных анализируемых молекул. Это может внести существенный вклад в изменение удерживания и порядка выхода компонентов. Если первоначально для прививки использовали силикагели с размерами пор 5–6 нм, то в последующем перешли к порам около 10 нм, а сейчас считают более целесообразным даже 15–30 нм. Это связано со все возрастающим использованием привитых сорбентов для анализа р больших по молекулярной массе биополимеров, таких, как белки, полипептиды и др.

Кроме размера пор, большую роль играет объем пор силикагеля и его поверхность. Если рост поверхности дает увеличение количества силанольных групп (их плотность около 5 на 1 нм2) и количества привитой фазы при равной плотности прививки, то рост объема пор играет сложную роль. При увеличении объема пор не только увеличивается проницаемость силикагеля, но и уменьшается объем самого диоксида кремния и соответственно прочность силикагеля; он легче разрушается в процессе транспортировки, при набивке колонок, повышении давления при эксплуатации колонок. Правда, прочность определяется не только толщиной стенок ячеек силикагеля, но и их структурой.

Относительно распределения пор силикагеля по размеру можно сказать, что есть образцы как с более узким, так и с более широким распределением. Кажется желательным иметь более узкий диапазон распределения пор по размерам, так как в этом случае однородность пор приводит к большей однородности прививки, ситовых эффектов и др.

Для качественной прививки фазы к силикагелю важна подготовка его поверхности перед прививкой. Поверхность должна быть полностью гидроксилирована и не содержать сорбированной воды. Если гидроксилирование поверхности проведено не полностью (например, силикагель пересушен выше 180–200 °С) это приводит к тому, что образовавшиеся силоксановые группы не вступают в реакцию прививки, и количество привитой фазы уменьшается. С другой стороны, при последующем использовании такого сорбента его свойства в процессе эксплуатации в водных средах будут меняться, так как возможен гидролиз силоксановых групп с образованием новых активных силанольных групп.

Гидроксилирование проводят кипячением силикагеля в воде в присутствии кислот в течение нескольких часов и затем сушат при температуре до 150 °С. Сушка должна обеспечить удаление физически сорбированной воды, так как она приводит к бесполезному расходу прививаемого хлорсилана, загрязнению сорбента побочными продуктами реакции и изменению выбранного мольного соотношения хлорсилана и силанольных групп.

Следует ли предпочесть сферические частицы матрицы частицам неправильной формы? Однозначного ответа нет. Но большинство исследователей предпочитают частицы правильной сферической формы, которые должны давать более плотно и равномерно упакованный слой сорбента, снижать сопротивление потоку, меньше разрушаться в процессе набивки и работы колонок и т.п. Пока никто еще убедительно не продемонстрировал заметных преимуществ сферических частиц; однако следует отметить, что большинство вновь появляющихся сорбентов являются сферическими микрочастицами.

Остановимся теперь на выборе прививаемого агента. Если вначале были испробованы многие классы прививаемых агентов, то в настоящее время практически остался один тип – хлop- или алкоксипроизводные алкилсиланов, дающие в провесе прививки довольно стойкую к гидролизу или расщепленную связь Si-О–Si-С. Метод прививки с образованием еще более прочной связи Si-С, заключающийся в замене в силанольных группах силикагеля гидроксильной группы на галоген (хлорирование силикагеля) и последующем взаимодействии галогена, например с бензиллитием используется только в исследовательской работе и мало пригоден для промышленного роизводства из-за взрывоопасности и нетехнологичности.

Алкилхлорсиланы, наиболее дешевые и доступные из прививаемых агентов, могут быть трех типов: алкилтрихлорсиланы, диалкилдихлорсиланы и триалкилхлорсиланы (вместо алкила может быть и арил). Из этих трех наиболее дешевый и доступный продукт – алкилтрихлорсиланы, которые и использовались практически во всех ранних работах и в производстве первых привито-фаэных сорбентов, появившихся на рынке. Однако для получения мономерного привитого слоя с применением этИХ силанов, имеющих три реакционноспособные группы, требуется очень высокий технический уровень работы, который относительно легко достигается в лаборатории, но трудно достижим на производстве. Если трихлорсиланы вступают в кон-акт с любым содержащим следы воды веществом (недосушенным силикагелем, воздухом, растворителем и др.), они немедленно отнимают воду, вступая в реакции.

Образующиеся при этом димеры, тримеры и продукты с еще большей степенью полимеризации реагируют с силанольнымв группами силикагеля, давая вместо мономерного привитой полимерный слой фазы. Этот полимерный слой, естественно, является неравномерным и большим по толщине, чем мономерный. Диффузия анализируемых молекул в таких более толстых пленках замедлена, и как правило, эффективность колонок с такими сорбентами более низкая. Другим недостатком является то, что те атомы хлора в молекуле, которые не прореагироваЛИ с силанольными группами из-за пространственных затруднений, могут в дальнейшем гидролизоваться в процессе работы вводными растворителями с образованием полярных силанольных групп. Последние могут взаимодействовать с анализируемыми веществами, имеющими полярные группы, изменяя времена удерживания.

Однако полимерные слои, особенно имеющие небольшую толщину и получаемые при малой степени полимеризации трихлорсиланов до и в процессе прививки, имеют и некоторые преимущества перед мономерным привитым слоем. В частности, если толщина слоя небольшая, то скорость диффузии анализируемых молекул уменьшается незначительно; в то же время такая полимерная молекула соединена с силикагелевой матрицей не одной, как мономерная, а многими связями. Поэтому разрыв одной связи, например, в результате гидролиза, приводит к отрыву и переходу в подвижную фазу мономерной молекулы, тогда как полимерная удерживается на месте другими связями и продолжает участвовать в разделении до разрыва всех удерживающих ее связей. Это важно, если по условиям анализа требуется использовать растворитель с рН<3 или >8, что ускоряет протекание гидролиза и отщепления привитой фазы.

Как видно из приведенной схемы димеризации алкилтрихлорсилана, если исходная молекула имеет три реакционно-способных хлора, то димер – четыре, соответственно тример будет иметь их 5, тетрамер – 6 и т.д. В этом случае, как мы видим, с увеличением молекулярной массы полимера число потенциальных центров прививки молекулы к силикагелю растет. Однако и пространственные затруднения при взаимодействии такой молекулы с силикагелевой матрицей также возрастают по мере роста ее молекулярной массы, поэтому по мере достижения некоторой молекулярной массы количество реально образующихся связей прививаемой фазы и силикагелевой матрицы доходит до максимума, а в дальнейшем начинает снижаться.

По приведенным выше схемам прививают такие распространенные агенты, как октилтрихлорсилан, октадецилтрихлорсилан и др.

По несколько другой схеме полимеризация осуществляется, если прививаемый агент – диалкилдихлорсилан (или алкиларилдихлорсилан, или диарилдихлорсилан).

Образующиеся при этой реакции димеры, тримеры и полимеры также могут реагировать с силанольными группами силикагеля, давая вместо привитого мономерного привитой полимерный слой фазы. Однако этот полимер отличается от того, который образуется при реакции с силикагелевой матрицей алкилтрихлорсиланов. Первое отличие состоит в том, что он получается линейным по цепи – Si-О–Si-О–Si-О–, поскольку исходный диалкилдихлорсилан и его димер, тример, тетрамер и т.д. являются бифункциональными и содержат по два активных атома хлора. Во-вторых, если прививка такого полимера к силикагелевой матрице происходит, она идет только в одной или в двух точках, т.е. отрыв при гидролизе такой привитой молекулы протекает более легко (достаточно разорваться одной или двум связям, и молекула полимера отрывается от матрицы и переходит в подвижную фазу). По указанной схеме прививают диметилдихлорсилан, дифенилдихлорсилан и др.

Наконец, если прививаемый агент является триалкилмонохлороиланом, он тоже может реагировать с водой, присутствующей в реакционной среде. Однако его реакционная способность значительно ниже, чем у ди- и трихлорсиланов.

Так как димер не имеет реакционноспособных атомов хлора то он не вступает ни в реакцию дальнейшей полимеризации, ни в реакцию прививки к силикагелевой матрице. Это очень важно, ибо в этом случае при прививке получается гарантировано только мономерный привитой слой неподвижной фазы. Образовавшийся димер в дальнейшем удаляется при отмывке непрореагировавшего реагента и побочных продуктов реакции. Последний способ прививки, как видно из обсуждения, дает наиболее упорядоченный по структуре и составу привитый слой. Поэтому хотя стоимость таких исходных реагентов несколько выше, а реакционная способность их ниже, что забавляет вести прививку в более жестких условиях и брать избыток прививаемого реагента, популярность таких сорбентов растет, и большая часть вновь появляющихся сорбентов, как отмечено в рекламных данных, получена с использованием этого метода прививки. По такой схеме прививают октилдиметилхлорсилан, октадецилдиметилхлорсилан, триметилхлорсилан и др.

Какие же алкильные группы можно химически привить указанными способами к поверхности силикагеля? Наиболее применимы длинные алкильные цепи, обычно C8 и C18, но в последнее время растет популярность привитых более коротких алкилов С4 и С3, особенно на силикагелях с широкими порами для анализа биологически важных больших молекул. Чаще всего применяют привитой октадецилсилан. Он наиболее сильно удерживает анализируемые вещества и позволяет работать с элюентами, содержащими мало воды. Это целесообразно, так как анализируемые вещества, как правило, лучше растворяются в метаноле или ацетонитриле, чем в воде. Кроме того, аномально высокая вязкость смесей метанола и воды существенно снижается при большом содержании метанола, что позволяет работать при сравнительно низком давлении на колонке с боль-Вой эффективностью за счет повышения скорости диффузии при снижении вязкости.

Арильные (ароматические) привитые группы получают аналогичным способом, однако их используют реже. Они позволяют получить селективность, отличающуюся от селективности на привитых алкильных группах.

По мере роста длины цепи прививаемой молекулы ее реакционная способность уменьшается за счет пространственных затруднений при взаимодействии с силанольными группами силикагеля. Если из 5 силанольных групп, приходящихся на 1 нм2 поверхности силикагеля, почти все удается заместить при прививке алкила C1, то при алкиле C18 в лучшем случае удается заместить половину из них. Оставшиеся на поверхности не вступившие в реакцию силанольные группы экранируются уже привитыми молекулами и не могут вступить в реакцию с новыми молекулами октадецилхлорсилана. Однако для молекул с меньшей молекулярной массой, будь то молекулы растворителя или анализируемых веществ, пространственная затрудненность может оказаться недостаточно большой, чтобы воспрепятствовать их взаимодействию. Это может существенно изменить вид хроматограммы, которая покажет аномально большое удерживание (иногда с заметным уширением пика) для таких анализируемых молекул.

Для того чтобы более полно устранить силанольные группы на поверхности, которые остались после прививки октадецилхлорсилана, проводят окончательное закрытие («энд кэппинг») их путем обработки силилируюшими агентами, имеющими малый размер молекул, обычно триметилхлорсиланом. Такие малые молекулы легко вступают в реакцию с частично экранированными силанольными группами. Аналогичную реакцию окончательного блокирования силанольных групп на поверхности силикагеля часто используют в тех случаях, когда прививку фазы проводят полимеризующимися три-и дихлорсиланами. Устранение силанольных групп с поверхности и их замена на триметилсилильные гидрофобные группы повышает также устойчивость силикагельной матрицы к воздействию воды, особенно при рН менее 3 и более 8.

Условия проведения «энд кэппинга», в том числе предварительная подготовка и обработка поверхности с целью перевода оставшихся непрореагировавших атомов хлора в гидроксильные или другие реакционноспособные группы, выбор растворителей, катализаторов, условий реакции, как правило, составляют «ноу хау» фирмы. Часто проведение «энд кэппинга» практически не меняет таких характеристик сорбента, как содержание углерода, удельная поверхность и др., однако характер взаимодействия с поверхностью такого сорбента для молекул, имеющих полярные группы, особенно обладающие кислотными или основными свойствами, изменяется очень резко.

Наряду с алкильными и арильными группами таким же путем, используя замещенные моно-, ди- и трихлорсиланы, можно к силикагелевой матрице привить и другие группы, наиболее распространенными из которых (в порядке уменьшения частоты применения) являются следующие: – Si – (СН2) 3-СN-алкилнитрильная группа; – Si – (СН2) зNН2-алкиламинная группа (возможна вторичная или третичная аминогруппа), слабый анионообменник; – Si – (СН2) з–СН (ОН) – СН2ОН – алкилдиольная группа; – Si-СН2-С6Н4-SO3H-сильный катионообменник, содержащий сульфогруппу (или сульфогруппы); – Si – [Alk4N]+OH- – сильный анионообменник, содержащий четвертичную аммониевую группу.

Если алкилнитрильную и алкиламинную группы прививают, как правило, за один прием, то прививка других групп более сложна и включает ряд последовательных реакций (две или три). Такие сорбенты, естественно, более сложны в производве, и воспроизводимость их характеристик ниже, тогда как стоимость значительно выше.

Алкилнитрильную, алкиламинную и алкилдиольную привитые фазы можно использовать в разных вариантах хроматографии. Прежде всего они могут быть применены для работы с неполярными растворителями типа гексан – изопропанол, где они проявляют свойства, близкие к свойствам силикагеля без привитой фазы. Однако их селективность отличается от селективности силикагеля, что позволяет подобрать наилучший сорбент для каждого анализа. Кроме того, их преимуществом перед силикагелем является более быстрое уравновешивание с растворителем, и это позволяет использовать их при работе с изменением состава растворителя в процессе анализа, т.е. с градиентом растворителя. Они также менее чувствительны к влиянию воды.

Алкилнитрильную фазу используют и в обращенно-фазной хроматографии, селективность при этом получается иная, чем на силикагелях с алкильной группой. Такой же эффект наблюдается при применении алкиламинной группы. Кроме того, она проявляет слабые анионообменные свойства, что часто используют при анализе биологически активных веществ, например олигодигонуклеотидов с градиентами по рН и силе буферного раствора. Алкилдиольную группу, кроме нормально-фазной хрома-графии, применяют как фазу, позволяющую работать с белками в режиме эксклюзионной хроматографии, которая не сорбирует необратимо и не денатурирует их, сохраняя биологическую активность белков.

Сильные катионо- и анионообменники находят применение анализе биологических жидкостей для определения ряда лекарственных препаратов, биогенных аминов, их метаболитов и др. Разработан метод ион-парной хроматографии, в котором используют динамические слои катионо- или анионоактивных агентов, обладающие свойствами ионообменников и в то же время обращенно-фазных сорбентов. Эти слои наносят из растворителя, содержащего ион-парный реагент, (обычно алкил-сульфокислоты или тетраалкиламмониевые основания), пропуская его через сорбент для обращенно-фазной хроматографии. Ион-парная обращенно-фазная хроматография является методом анализа смеси ионизирующихся и неионизирующихся веществ.

Многие производители сорбентов не выпускают полного ассортимента сорбентов всех описанных выше типов, поскольку ограниченный спрос на такие сорбенты не окупает затрат на их разработку и производство. Есть фирмы, выпускающие не только все перечисленные сорбенты, но и дополнительно ряд других с привитыми нитрогруппами, карбокси- и карбоксиметильными группами, оптически активными фазами и т.д. Практически все фирмы выпускают основной ассортимент привитых фаз, который включает C8, C18, нитрильную и аминофазы, различающиеся также по зернению.

Несмотря на большую и все возрастающую популярность сорбентов с привитыми фазами, до сих пор вопрос о механизмах разделения на них остается не совсем ясным и часто поднимается в дискуссиях, где высказываются различные, нередко противоположные мнения о их роли в процессах разделения. Если на разделение и удерживание влияет несколько механизмов, то вклад каждого определяется несколькими факторами; основными являются свойства поверхности сорбентов, состав элюента и химическая природа каждого из анализируемых веществ.

Рассмотрим концепции о действии механизмов разделения, например в случае обращенно-фазных сорбентов, получивших наибольшее распространение.

Первоначальное представление о работе обращенно-фазных сорбентов было высказано, когда перешли от нанесенных на силикагель полимерных жидких фаз (жидкостно-жидкостная хроматография) к октадецилтряхлорсилану и его аналогам, химически привитым на поверхность силикагеля в пелликулярных материалах, дававшим привитую довольно толстую полимерную пленку фазы. Поэтому первый подход к привитой фазе был как к пленке жидкости на носителе, разделение на которой происходит за счет разных коэффициентов распределения анализируемых веществ между двумя жидкостями – растворителем и привитой фазой, т.е. за счет абсорбции. Такой подход получил признание, как позволивший получить и предсказать линейную зависимость удерживания неполярных гомологов, таких, как алкилбензолы. Этот же подход был распространен в дальнейшем и на привитые монослои алкилсиланов, хотя здесь он представляется более удаленным от действительности, поскольку жидкости как таковой на поверхности нет, а есть только отдельные привитые химически молекулы, «раствориться» в которых молекула анализируемого вещества не может. В этом случае может идти речь о взаимодействии молекул привитой фазы и анализируемого вещества за счет межмолекулярных сил.

Первоначальное представление о механизме разделения на ращенных фазах оказалось верным, однако для веществ более сложного строения с функциональными группами отклонения были частыми и большими. Развитием этой концепции было предположение о том, что на поверхности обращенно-фазного сорбента из растворителя, который содержит подобий привитому слою компонент (метанол или ацетонитрил), и менее ему подобный (вода), образуется удерживаемый силами адсорбции слой жидкой фазы, обогащенный менее полярными компонентами (метанолом). Этот слой имеет другой состав, чем подвижная фаза, и заметно отличается от привитой фазы по своей природе. Поэтому, участвуя в разделении анализируемых веществ, такой слой сильно взаимодействует с полярными группами веществ по другому механизму, чем привитой слой.

Для более полного представления о сложности механизмов разделения следует учесть, что силанольные группы, пространственно недоступные при прививке неподвижной фазы из-за большого объема триметилсилил-, диметилоктадецилсилил или диметилоктилсилильных групп, остаются на поверхности сорбента в большом количестве (около половины от имевшихся на поверхности исходного силикагеля). Они являются пространственно доступными для малообъемных небольших молекул, таких, как молекулы воды, метанола, ацетонитрила, которые способны взаимодействовать с ними, давая поляризованные слои растворителей также другого состава и свойств, чем использованный растворитель. Эти поляризованные молекулы также взаимодействуют с молекулами анализируемых веществ и дают свой вклад в удерживание. Наконец, силанольные группы имеют слабокислотную функцию и могут участвовать в разделении, действуя как ионообменники, взаимодействуя не только с анализируемыми веществами, но и извлекая ионы металлов переменной валентности, такие как железо, хром, никель и другие присутствовавшие в растворителе, пробе или образующиеся в результате коррозионных процессов в аппаратуре. Показано, чтo на поверхности сорбента, находящегося в аналитической бращенно-фазной колонке размером 4,6 Х 250 мм, может сорбироваться более десяти микрограммов железа. Ионы металлов переменной валентности также участвуют в разделении, взаимодействуя с некоторыми из анализируемых веществ. Вклад в разделение вносят и эксклюзионные процессы, по-разному действующие на молекулы малой и большой молекулярной массы.

Таким образом, оценить по параметрам удерживания вклад каждого из механизмов разделения и сформулировать гипотезу возможно применительно к молекулам родственного строения; для достаточно сложных молекул или смесей, очевидно, еще долго это не будет возможным даже при использовании мощного математического аппарата. Выбор оптимальных условий разделения с учетом возможных механизмов взаимодействия сорбента и анализируемых компонентов смесей еще долго будет оставаться основной проблемой при разработке аналитических методик в ВЭЖХ.

**Литература**

1. Fitzpatrick F.A., Wanalda M.A., Kaiser D.G./Anal. chem, 1977, v. 49, p. 1032.
2. Dunlap K.L., Sandridge R.L., Keller /./Anal. Chem, 1976, v. 48, p. 297.
3. Poole C. F, e. a./J. High Resol. Chromatogr. Commun., 1978, v. 1, p. 83.
4. Denkert M. e. a./J. Chromatogr, 1981, v. 218, p. 31–43.
5. Bartha A. e. a./J. Chromatogr, 1984, v. 303, p. 29–38.
6. Gloor R., Johnson E.L./J. Chromatogr. Sci, 1977, v. 15, p. 413–423.
7. Kraak J.C., Jonker K.M., Huber J.F.K./J. Chromatogr, 1977, v. 142, p. 671–680.
8. Wehli A. e. a./J. Chromatogr, 1979, v. 149, p. 199–210.
9. Даванков В.Л. / Журн. ВХО им. Менделеева, 1983, т. XXVIII, №1, с. 25–29.
10. Даванков В.А. // в кн. Прикладная хроматография / Под ред. К.И. Сако-дынского. М, Наука, 1984, с. 24–32.
11. Davankov V.A., Kurganov A.A., Bochkov A.S./fln Advances in Chroma-tography/ed. J.C. Giddings e. a. N. Y, M. Dekker, 1983, v. 22, p. 139 – 185.
12. Apffel J.A., Alfredson T.V., Major R.E./J. Chromatogr, 1981, v. 206, p. 43–57.